

STABLE RADIOIODINE CONJUGATES AND METHODS FOR THEIR SYNTHESIS

Publication number: DE69702398 (T2)

Publication date: 2001-02-15

Inventor(s): GOVINDAN V [US]; GRIFFITHS L [US]

Applicant(s): IMMUNOMEDICS INC [US]

Classification:










- international: **A61K51/00; A61K38/00; A61K39/395; A61K51/08; A61P43/00; C07H3/04; C07K1/107; A61K51/00; A61K38/00; A61K39/395; A61K51/02; A61P43/00; C07H3/00; C07K1/00; (IPC1-7): C07K1/107; A61K51/08; C07H3/04**

- European: A61K51/08Z; C07H3/04; C07K1/107D4

Application number: DE19976002398T 19970827

Priority number(s): US19960024738P 19960828; WO1997US14998 19970827

Also published as:

 WO9808548 (A2)
 WO9808548 (A3)
 JP2000517316 (T)
 EP0915710 (A2)
 EP0915710 (B1)
 CA2263985 (A1)
 AU4328797 (A)
 AU718859 (B2)
 AT194143 (T)

<< less

Abstract not available for DE 69702398 (T2)

Abstract of corresponding document: **WO 9808548 (A2)**

Methods are described for conjugating radioiodinated peptides or carbohydrate structures to proteins with improved yields and qualities of conjugates. In one method, specially designed radioiodinated bifunctional peptides containing nonmetabolizable amide bonds are coupled to antibodies. In a second method, radioiodinated nonmetabolizable bifunctional peptides, which also contain aminopolycarboxylates, are coupled to antibodies. In a third method, radioiodinated bifunctional aminopolycarboxylates are coupled to antibodies. In a fourth method, a hydrazide-appended antibody is coupled to a radioiodinated carbohydrate, or a thiolated antibody is coupled to a hydrazide-appended and radioiodinated carbohydrate. In a fifth method, a monoderivatized cyanuric chloride is used to conjugate thiolated antibody.; Radioiodinated residualizing antibody conjugates made by these methods are particularly stable in vivo and are suitable for radioimmunodetection and radioimmunotherapy.

.....
 Data supplied from the **esp@cenet** database — Worldwide



INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification ⁶ : A61K 51/00	A2	(11) International Publication Number: WO 98/08548 (43) International Publication Date: 5 March 1998 (05.03.98)
(21) International Application Number: PCT/US97/14998 (22) International Filing Date: 27 August 1997 (27.08.97) (30) Priority Data: 60/024,738 28 August 1996 (28.08.96) US (60) Parent Application or Grant (63) Related by Continuation US 60/024,738 (CON) Filed on 28 August 1996 (28.08.96) (71) Applicant (for all designated States except US): IM-MUNOMEDICS, INC. [US/US]; 300 American Road, Morris Plains, NJ 07950 (US). (72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (for US only): GOVINDAN, Serengulam, V. [IN/US]; 106 Passaic Avenue, Summit, NJ 07901 (US). GRIFFITHS, Gary, L. [GB/US]; 36 Edgehill Avenue, Morristown, NJ 07960 (US). (74) Agents: SAXE, Bernhard, D. et al.; Foley & Lardner, Suite 500, 3000 K Street N.W., Washington, DC 20007-5109 (US).		(81) Designated States: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO patent (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Published <i>Without international search report and to be republished upon receipt of that report.</i>
(54) Title: STABLE RADIOIODINE CONJUGATES AND METHODS FOR THEIR SYNTHESIS		
(57) Abstract <p>Methods are described for conjugating radioiodinated peptides or carbohydrate structures to proteins with improved yields and qualities of conjugates. In one method, specially designed radioiodinated bifunctional peptides containing nonmetabolizable amide bonds are coupled to antibodies. In a second method, radioiodinated nonmetabolizable bifunctional peptides, which also contain aminopolycarboxylates, are coupled to antibodies. In a third method, radioiodinated bifunctional aminopolycarboxylates are coupled to antibodies. In a fourth method, a hydrazide-appended antibody is coupled to a radioiodinated carbohydrate, or a thiolated antibody is coupled to a hydrazide-appended and radioiodinated carbohydrate. In a fifth method, a monoderivatized cyanuric chloride is used to conjugate thiolated antibody. Radioiodinated residualizing antibody conjugates made by these methods are particularly stable <i>in vivo</i> and are suitable for radioimmunodetection and radioimmunotherapy.</p>		

FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AL	Albania	ES	Spain	LS	Lesotho	SI	Slovenia
AM	Armenia	FI	Finland	LT	Lithuania	SK	Slovakia
AT	Austria	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Senegal
AU	Australia	GA	Gabon	LV	Latvia	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaijan	GB	United Kingdom	MC	Monaco	TD	Chad
BA	Bosnia and Herzegovina	GE	Georgia	MD	Republic of Moldova	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tajikistan
BE	Belgium	GN	Guinea	MK	The former Yugoslav Republic of Macedonia	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Greece	ML	Mali	TR	Turkey
BG	Bulgaria	HU	Hungary	MN	Mongolia	TT	Trinidad and Tobago
BJ	Benin	IE	Ireland	MR	Mauritania	UA	Ukraine
BR	Brazil	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Iceland	MX	Mexico	US	United States of America
CA	Canada	IT	Italy	NE	Niger	UZ	Uzbekistan
CF	Central African Republic	JP	Japan	NL	Netherlands	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norway	YU	Yugoslavia
CH	Switzerland	KG	Kyrgyzstan	NZ	New Zealand	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Democratic People's Republic of Korea	PL	Poland		
CM	Cameroon	KR	Republic of Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kazakhstan	RO	Romania		
CU	Cuba	LC	Saint Lucia	RU	Russian Federation		
CZ	Czech Republic	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Germany	LK	Sri Lanka	SE	Sweden		
DK	Denmark	LR	Liberia	SG	Singapore		
EE	Estonia						

STABLE RADIOIODINE CONJUGATES AND
METHODS FOR THEIR SYNTHESIS

5

Field of the Invention

This invention relates to the preparation of reagents used in radioimmunodetection and radioimmunotherapy and specifically to the preparation of radioiodine labeled conjugates having enhanced stability in vivo and enhanced retention at tumor sites.

10

Background of the Invention

Radioiodinated monoclonal antibodies are important for the diagnosis and therapy of cancer as summarized by Goldenberg in *Amer. J. Med.* 94: 297-312 (1993). A number of methods have been developed over the last thirty years to chemically introduce radioiodine into monoclonal and polyclonal antibodies for these uses. Iodine is preferred as a radiolabel in these applications because the chemistry used for radioiodination of protein is relatively easy, radioiodine has useful physical decay characteristics, and isotopes of iodine are commercially available.

15

20

Among useful iodine isotopes are Iodine-124, which has been used to radiolabel antibodies as described by Pentlow et al., *Journal of Nuclear Medicine*, 37: 1557-62 (1996), and Iodine-125, which has been used for detection using an intraoperative probe as described by Martin et al., *Cancer Investigation*, 14: 560-71 (1996). In the context of using these iodine isotopes, one concern is the long circulation time of radioiodinated antibodies, which leads to high background radiation. The high background problem is compounded by the loss of radioiodine from target cells, when standard radioiodination methods are used. A poor target to non-target ratio of delivered iodine often results from the

30

35

high background and radioiodine loss problems. Accordingly, a principal aim in the art is to improve the target to non-target ratio.

5 Iodine-125 has been proposed for therapy purposes because of its cascade Auger electrons as described by Aronsson et al., *Nuclear Medicine and biology*, 20: 133-44 (1993). Clearly, optimum use of a long-lived [$t_{1/2}$, 60 days] low energy-emitting nuclide demands that intracellular target retention be achieved; which is not
10 possible with conventional radioiodination methods.

Various chemistries have been developed to link iodine to antibodies that target cancer cells. These chemistries have been reviewed by Wilbur, *Bioconjugate Chemistry* 3: 433-70 (1992). The most common linking
15 procedure has been to prepare *in situ* an electrophilic radioiodine species to react with a functional group on an antibody. Reagents such as chloramine T and iodogen have been employed to generate electrophilic iodine. A tyrosine group on protein is usually the site of
20 iodination. However, the presence of a harsh oxidant or reductant may lead to structural impairment of an antibody. For this reason, an alternative approach is to iodinate a small organic molecule and couple the pure iodinated species to antibody. N-Succinimidyl 3-(3-iodo-
25 4-hydroxyphenyl) propionate (Bolton-Hunter reagent) is an example of the latter category. These and other methods have been reviewed by Wilbur (Id).

A major drawback with using the foregoing radioiodination schemes is the phenomenon of *in vivo* deiodination. As a result of antibody internalization and lysosomal processing *in vivo*, a labelled protein is
30 degraded to small peptides, and its radioiodine is released from the cell in the form of iodotyrosine or as iodine attached to a low molecular weight peptide fragment. These findings have been reported by Geissler
35 et al., *Cancer Research* 52: 2907-2915 (1992) and Axworthy et al., *J. Nucl. Med.* 30: 793 (1989). Such *in vivo* removal of radioiodine from target cells has a profound

bearing on the use of iodine isotopes for radiodiagnosis and radiotherapy. Discrimination between tumor and non-tumor that is relevant to diagnosis and therapy, and the prolonged retention of isotope on a tumor cell, relevant to radiotherapy, are severely compromised by the occurrence of *in vivo* deiodination. This is readily appreciated if one considers the 8-day half-life of iodine-131, which is widely used for radioimmunotherapy investigations. If antibodies radioiodinated with this isotope are metabolized with consequent removal of the isotope from the target cells within the first 24-120 h post-injection of the reagent, the advantage of the lengthy half-life of this isotope for therapy is lost. That is, the useful half-life of this isotope is not exploited in a prolonged tumoricidal effect because of the above-described drawback of conventional radioiodination chemistry.

In contrast to this drawback of conventional chemistry, the action of *in vivo* deiodinases in releasing iodine in the form of molecular iodine from the cell is less significant to the problem of optimizing the target to non-target ratio of radioisotope accumulation. Workers in this field have attempted to prepare iodinated proteins that do not 'deiodinate' by the action of *in vivo* deiodinases as reviewed by Wilbur et al., *Journal of Nuclear Medicine*, 30: 216-26 (1989). But these attempts have failed to show improvement in cellular retention of radioiodine. The reason for these failures is that, contrary to what was expected, the metabolic clearance of intact iodotyrosine was more important to clearance of isotope than was the deiodination of tyrosine to liberate radioiodine.

One way to overcome the unacceptably fast release of radioiodine from conjugate is to attach iodine to non-metabolizable carbohydrate and to conjugate the resultant entity to antibodies. After antibody catabolism within a tumor cell, the radioiodine remains stably attached to the carbohydrate and thus is trapped inside the cell.

These carbohydrate labels, referred to as 'residualizing labels', are exemplified by Strobel et al., *Arch. Biochem. Biophys* 240: 635-45 (1985) and Ali et al., *Cancer Research (suppl)* 50: 783s-88s (1990). However, these methods, when applied to the labelling of monoclonal antibodies (Mabs), suffer from one or both of the following drawbacks: (1) Very low radiolabeling yields (3-6 %) and (2) formation of aggregates (up to 20%). Low conjugation yield necessitates handling a large amount of radioactive iodine to incorporate sufficient radioactive label in antibody. This approach causes a radiation safety concern as well as wastage of most of the unusable radioactivity. As a result, the specific activity achieved by this method suffers. Furthermore, aggregate formation can lead to reduced tumor uptake and will lead to enhanced liver uptake, and thereby impair the effectiveness of the radiolabel method. The full advantage of using residualizing labels for radioimmuno-detection and radioimmunotherapy cannot be realized unless progress can be made to limit the twin problems of poor radiolabeling yield and aggregate formation when using carbohydrate-based reagents. Using novel substrates and methodologies to address these issues is another aspect of this invention.

One well known approach to this problem is to label the antibody with a radiometal ion such as indium-111 or an isotope of yttrium, using a bifunctional aminopolycarboxylate ligand such as bifunctional EDTA or bifunctional DTPA. These radiolabelled conjugates exhibit prolonged retention of radiometal in tumor as exemplified in in vivo animal experiments by Stein et al., *Cancer Research* 55: 3132-39 (1995). That is, radiometal ions chelated to aminopolycarboxylates also behave, in vivo, as residualizing labels. Thus, the problem of residualization generally applies to techniques that use these labels as well.

The prior art has addressed the issue of residualizing iodine labels by using non-metabolizable

sugars to which an iodlatable group is attached. An iodlatable group such as tyramine is reductively coupled to the carbohydrate, so that there is no metabolizable peptide bond between tyramine and the sugar entity. There are two main problems encountered with these prior art methods. These are in the antibody-coupling steps. One method, that of Strobel et al. (see above), uses a carbohydrate-adduct derived from lactose, and couples proteins and antibodies to the same by first oxidizing the galactose portion of such adducts with galactose oxidase. Usually poor overall yield (3-6%) is obtained, as described by Stein et al. *Cancer Research*, 55: 3132-3139, (1995). Furthermore, lactose is an inefficient substrate for galactose oxidase. In examining a number of galactose-containing carbohydrate derivatives for their ability to be oxidized by this enzyme, Avigad et al. (*J. Biol. Chem* 237: 2736-2743, (1962)), determined that lactose had less than half the affinity of D-galactose for galactose oxidase, and was oxidized fifty times slower compared to galactose. This inefficient step therefore contributes to overall reduced radioisotope incorporation into antibodies.

Another approach involved in coupling to antibodies does not make use of any special property such as the ability of the carbohydrate to be selectively derivatized by an enzyme (such as galactose oxidase oxidation involving galactose moiety), but makes use of cyanuric chloride as the cross-linker to link both the iodinated carbohydrate and antibody. This approach has the serious problem of generating antibody aggregates.

Cyanuric chloride has been used to form conjugates but unfortunately this reagent contains three reactive chlorines and consequently forms aggregates. Another factor involved in aggregate formation is the presence of multiple amino residues in antibodies that can bind to the residualizing agent and/or coupling reagent, particularly with carbohydrate residualizing agents that couple to protein by reductive amination. Such multiple

binding causes aggregates to form, and results in low specific activity of radiolabel in the prepared conjugate mixture. Accordingly, coupling agents are needed that do not cause aggregate formation.

5

Summary of the Invention

The present invention solves the above-identified problems by providing preparation methods and compositions of iodlatable peptides consisting of unnatural D-amino acid components. The radioiodinated versions of these conjugates are used to label antibodies and produce residualizing labels.

The present invention also is directed to the design of bifunctional iodlatable aminopolycarboxylate adducts wherein the iodlatable group is attached to the said aminopolycarboxylate unit via a non-metabolizable peptide bond. The adducts are radioiodinated and conjugated to Mabs or their fragments, and thereby introduce residualizing label into biospecific Mabs.

The present invention additionally is directed toward the design of new methodologies to improve yields in the radioiodination of monoclonal antibodies using carbohydrate-based reagents.

The present invention is further directed to the design of carbohydrate-based reagents which improve the quality of residualizing label-antibody conjugates (with minimal aggregation) and thereby decrease non-target accumulation (especially in liver) of the label *in vivo*.

The present invention is also directed toward the ready attachment of such residualizing radioiodine labels to targeting vectors, including proteins such as monoclonal antibodies, fragments and constructs thereof.

In one embodiment, nonmetabolizable and radioiodinated peptides are used for labeling antibodies so that the radioactivity is residualized *in vivo*. These specially designed hydrophilic peptides preferably have a molecular weight of more than 500 (i.e. 5 amino acid

residues or more). More preferably, the peptide has a molecular weight of between 1000 and 4000 (10 to 40 amino acid residues) although in some cases more than 40 amino acids are acceptable. A hydrophilic peptide in the context used here means that the peptide contains polar amino acid units that are charged, such as aspartic acid, glutamic acid, lysine and arginine or that are polar, such as serine and threonine. The presence of multiple hydrophilic acid groups from these residues and their nonmetabolizable peptide bonds allow residualization of the radiolabel after antibody catabolism by lysosomes. Most preferred in this context are acidic amino acid residues such as aspartic acid.

D-amino acids comprise the peptide between the site of attachment of the peptide to an antibody and a radioactive iodine that is bound to a tyrosine or tyramine. Most particularly, within this region, no two adjacent amino acids are L-amino acids. Glycine in this context is an L-amino acid. By using D-amino acids in this way, the peptide bonds that connect the radioactive iodine to the antibody cannot be hydrolyzed in a lysosome.

In a second embodiment, a bifunctional aminopolycarboxylate system containing an iodlatable group is prepared by first synthesizing a peptide unit consisting of two differentially protected amino groups and unnatural D-amino acid units in the peptide mer. Sequential elaboration of the amino groups by adding an aminopolycarboxylate unit and then adding a protein cross linker completes the synthesis of the bifunctional aminocarboxylate. The peptide contains one or more unnatural D-tyrosine units. The amino acid units of the peptide are attached via non-metabolizable amide bonds. The antibody-binding group can be an amino residue (for site-specific attachments to oxidized carbohydrate of MAbs), an imidate or isothiocyanate (attachable to lysine groups of proteins), maleimide, bromo- or iodoacetamide residue (specific to thiols on MAbs) and the like. The

number of amino acid units in the peptide is two to ten, preferably three, of which at least one is D-tyrosine. The amino acid(s) immediately following the last D-tyrosine unit, and which are used to introduce antibody-binding cross-linkers, can be natural L-amino acids. The aminopolycarboxylate unit can be iminodiacetic acid, nitrilotriacetic acid, EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), DTPA (diethylenetriaminetetraacetic acid), TTHA (triethylenetetraminehexaacetic acid), DOTA (1,4,7,10-tetraaza cyclododecane N,N',N'',N'''-tetraacetic acid) or various backbone-substituted versions thereof, such as, for example, isothiocyanatobenzyl-EDTA/DTPA/TTHA/DOA, among numerous other aminopolycarboxylates and their derivatives which can be readily envisaged.

In a third embodiment, the bifunctional iodlatable aminopolycarboxylate is derived by attaching a tyramine group and an antibody-binding group to the aminopolycarboxylate. No protease-susceptible bond is involved in these structures. Alternatively, aminopolycarboxylates, backbone-substituted with an antibody-binding unit, are converted to corresponding dianhydrides which are then reacted with D-tyrosine to obtain an entity that contains two D-tyrosine residues. Since the amide bond(s) between the bifunctional aminopolycarboxylate and D-tyrosine will not be recognized by proteases, these constitute a different version of residualizing iodine labels.

One key feature in all of these systems is that the iodinated D-tyrosine moiety will be resistant toward deiodinases. This possibility is described by Dumas et al., *Biochem. Biophys. Acta* 293: 36-47 (1973).

In a fourth embodiment, a carbohydrate-based residualizing label is designed using a disaccharide which contains a galactose unit and which can be oxidized readily with galactose oxidase. This embodiment is exemplified by a preparation derived from melibiose. Another example is provided wherein the carbohydrate-based residualizing label is prepared which already

contains an antibody-binding group. Yet another aspect in this regard involves using hydrazide-appended antibodies for reaction with iodinated and derivatized carbohydrate.

5 In a fifth embodiment, a radioiodinated carbohydrate is allowed to react with a cyanuric chloride derivative which in turn is already derivatized to possess antibody-binding moiety.

Methods of the invention provide greater efficiencies of antibody labeling with residualizing iodine labels.
10 The methods also provide higher quality stable radioiodine conjugate preparations having a low aggregate content. Other objects and advantages will become apparent from the following detailed description.

Detailed Description

15 The present invention solves the problems of poor labeling efficiency and aggregate formation reported in the carbohydrate-based prior art in two general ways. In the first way, a new method is provided that allows oxidation of the galactose-containing carbohydrate-tyramine (or D-tyrosine) adduct by galactose oxidase.
20 The invention achieves this by using melibiose as the carbohydrate in the adduct. The affinity of melibiose for galactose oxidase is five times as high as that of galactose and ten-times as high compared to the affinity of lactose for galactose oxidase. Furthermore, melibiose
25 is oxidized at a rate comparable to galactose. Consequently, this method of the invention enhances the overall process yield obtained in the oxidation step. Overall incorporations of 18.7-20.7% (see Example-9) have
30 been achieved for the radioiodination of antibody using radioiodinated and oxidized (oxidation using galactose oxidase) dimelibiitoltyramine of the present invention. These incorporations are five-to-ten fold higher than yields observed in the radioiodination of the same
35 antibody, using radioiodinated and oxidized

dilactitoltyramine. An advantage of the present invention in this regard lies in utilizing a substrate (dimelibitoltyramine) which is oxidized readily by galactose oxidase. An additional invention in this context involves the use of hydrazide-appended antibodies which results in enhanced yield in the step of reductive coupling of carbohydrate addend to proteins.

The second way that the invention solves the prior art problems mentioned above is to improve the quality of iodinated antibody conjugate prepared by cyanuric chloride-mediated protein-carbohydrate coupling. This is achieved two ways: (1) by introducing one, or a limited number of more reactive hydrazide residues into an antibody that reacts preferentially with the coupling reagent, instead of the more numerous protein primary amine residues; and (2) by using cyanuric dichloride derivatives to couple antibody to residualizing label. As used in the invention, monosubstituted cyanuric chloride, prepared under non-aqueous conditions, carries a thiol-reactive entity such as maleimide, and is used for coupling to thiolated antibody. The second chlorine of this cyanuric dichloride is used to react with a phenolic hydroxyl group, such as that from a tyramine residue, while the thiol group of thiolated antibody reacts with maleimide group in a subsequent step. The third chlorine is unreactive, and is not a factor. Aggregate formation is therefore minimized and specific activity of the prepared conjugates is improved.

According to one aspect of the invention a radioisotope of iodine is attached in a non-metabolizable manner to a substrate. The iodine then becomes trapped within the acidic environment of lysosomes after antibody catabolism. The consequent prolonged retention of radioiodine within a target cell such as a tumor cell facilitates target organ dosimetry and enhanced target to non-target discrimination. In the context of tumor targeting this enhancement allows more effective radiodiagnosis and radiotherapy.

Another aspect of the invention is a new class of peptide-based residualizing labels. These residualizing labels address problems encountered in the use of carbohydrate-based iodine labels.

5 The use of peptide-based residualizing labels involves peptides consisting of one or more unnatural D-tyrosine units that are bonded to other unnatural amino acids. These peptides preferably contain hydrophilic amino acids such as D-aspartic acid and D-glutamic acid
10 units for increased hydrophilicity, and are of at least 5 amino acid residues in size. The amino terminal residue of these peptides can be an L- or D-amino acid, provided that if an L-amino acid, it is not directly attached to a tyrosine, and can be attached to a protein-binding
15 cross linker for later attachment to an antibody. Once radioiodinated and coupled to antibody, the iodinated peptide unit is residualized within a cell lysosome after attachment to a cell surface via binding and processing of the associated antibody. The presence of non-
20 metabolizable amide bonds, hydrophilic amino acid residues such as charged aspartic acid residues and glutamic acid residues, and a size greater than 4 amino acid residues collectively enable such residualization. Most preferred in this context is the use of aspartic
25 acid residues for the peptide.

 The conjugate's structure can be varied by using D-lysine at the peptide carboxyl terminus. This provides an ϵ -amine group for attaching an aminopolycarboxylate such as nitrilotriacetic acid (NTA), ethylenediamine-
30 tetraacetic acid (EDTA), diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) or triethylenetetraminehexaacetic acid (TTHA). In this embodiment, the ϵ -amine at the carboxyl end and the amine at the amine terminus are differentially protected for attaching an amino-
35 polycarboxylate and a cross-linker at designated loci. In this variation of the invention, D-aspartic acids in the peptide are optionally substituted with other amino acids. Yet another variation is the rational design of

aminopolycarboxylate systems which contain a radioiodinatable group such as tyramine as well as an antibody-binding moiety.

5 Products of the present invention deal with structural aspects which confer enhanced stability after the antibody is internalized and processed. It is this antibody processing that leads to diminished retention of radioiodine in tumor, which is exacerbated with internalizing antibodies. Our invention addresses this
10 issue by the design of a non-metabolizable peptide template which is also attached to aminopolycarboxylate and an iodinatable entity. By attaching polar groups such as DTPA to D-lysine which in turn is attached to D-tyrosine which is coupled to a protein binding moiety,
15 the invention ensures that the entire piece of aminocarboxylate-D-lysine-[I-125]-D-tyrosine portion will be trapped in lysosomes, after antibody processing, by virtue of the presence of protease-resistant peptide bonds, hydrophilic nature and the size. This is in
20 contrast to iodotyrosine, the catabolite of conventionally radioiodinated antibody, which readily escapes from the lysosomes and causes reduced radioactivity retention at the tumor sites.

25 Definitions

In the description that follows, a number of terms are utilized extensively. Definitions are provided here to facilitate understanding of the invention.

30 **Phosphate buffer.** As used herein, "phosphate buffer" refers to an aqueous solution of 0.1 M sodium phosphate that is adjusted to a Ph between 6.0 and 7.5.

Antibody. As used herein, "antibody" includes monoclonal antibodies, such as murine, chimeric, humanized or human antibodies, as well as antigen-binding
35 fragments thereof. Such fragments include Fab, Fab', F(ab)₂, and F(ab')₂, which lack the Fc fragment of an intact antibody. Such fragments also include isolated

fragments consisting of the light chain variable region, "Fv" fragments consisting of the variable regions of the heavy and light chains, (sFv')₂ fragments (see, for example: Tai et al., *Cancer Research Supplement*, 55:5983-5989, 1995), and recombinant single chain polypeptide molecules in which light and heavy variable regions are connected by a peptide linker.

Radioiodine-antibody conjugate. As used herein, a radioiodine-antibody conjugate is a molecule comprising at least one residualizing label and an antibody. A radioiodine-antibody conjugate retains the immunoreactivity of the antibody, i.e., the antibody moiety has roughly the same, or only slightly reduced, ability to bind antigen after conjugation compared to binding before conjugation with the residualizing label.

Residualizing label. "Residualizing label" is a radiolabel that is covalently attached to protein and has been designed to remain entrapped within lysosomes or another subcellular compartment following degradation of the carrier protein. Generally, residualizing labels are synthesized from molecules which themselves are not readily degraded in lysosomes. In general, these tracers have been radioactive carbohydrates or metal chelates of aminopolycarboxylates such as DTPA.

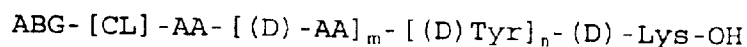
Any non-metabolizable carbohydrate is suitable for the present invention. Dimelibiotoltyramine (DMT) and melibiotoltyramine (MT) are some examples in this category. Bifunctional DTPA (or EDTA), either alone or as a D-tyrosine appended substrate, exemplifies the category of aminopolycarboxylates.

Aggregate. As used herein, an "aggregate" is a molecular complex comprising at least one extra polypeptide in addition to the desired antibody. The extra polypeptide is coupled directly or indirectly to the antibody by covalent means. Examples of aggregates are dimers, trimers and other multimers of the antibody. Macromolecular complexes comprised of more than one residualizing label per antibody can be considered

aggregates if by virtue of excessive labeling of antibody by residualizing label, the antibody binding activity is compromised. But the labeling of an antibody by multiple residualizing labels is often desired as a means to increase the specific radioactivity of the prepared antibody conjugate.

Five embodiments of the present invention are shown in SCHEMES I - VII below and are described *seriatim*.

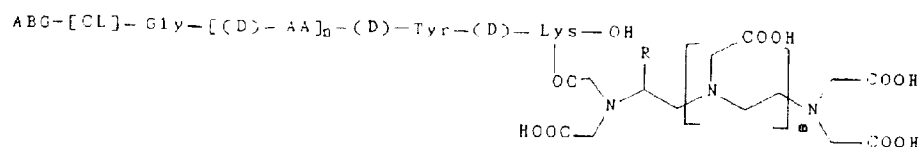
SCHEME I



Where m and n are each integers and $m+n=4-40$, AA represents an amino acid, D denotes a D-amino acid, CL is a cross linker and ABG is an antibody-binding group. The design of a peptide containing one or more D-tyrosine residues, one or more hydrophilic amino acids such as D-aspartic acid and other amino acids is achieved by using a resin. The Fmoc protected first amino acid (optionally shown as D-lysine) is anchored via its carboxyl end to a resin support such as from a chlorotriethyl-chloride resin. The peptide is elaborated by sequential addition of amino acids, each amine is protected by a Fmoc group and the carboxylic acid is activated. After forming each amide bond, the Fmoc group is removed. This removal allows coupling to the next carboxyl-activated Fmoc-protected D-amino acid. The assembly of peptides is thus a straightforward procedure. After liberating the final peptide from the solid support, the amine terminus is attached to a suitable heterobifunctional or homobifunctional cross-linker. Many of these cross-linkers are commercially available. One or more hydrophilic amino acids such as aspartic acid are introduced to increase the hydrophilicity of the peptide. The peptide thus formed has a minimum size of 5 amino acids. A metabolically stable D-tyrosine-containing

hydrophilic peptide made in accordance with the invention is useful as a residualizing iodine label.

SCHEME II

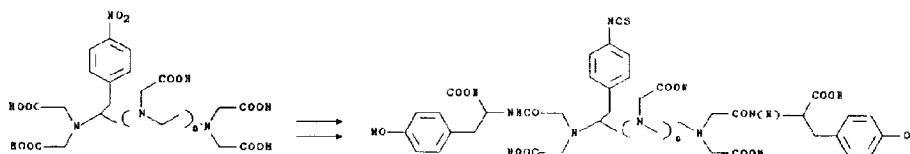


A variant of the above theme is to prepare a peptide that contains a D-lysine at its carboxyl terminus and attach the ϵ -amino group of this lysine to an aminopolycarboxylate such as, for example, EDTA, DTPA, and the like. In the general structure shown in SCHEME II, m is an integer having a value of 0, 1 or 2. In the peptide portion, the letter D denotes D amino acid, AA stands for amino acid and n is an integer of from 2 to 40. The amine terminus, shown here as glycine, is attached to a cross-linker CL which terminates in an antibody-binding group ABG. The latter can be any protein binding group such as a maleimide, haloacetamide, isothiocyanate, succinimide ester, imidate ester, and the like. Substituent R in the aminopolycarboxylate is hydrogen or a group such as 4-isothiocyanatobenzyl to which the peptide portion is attachable. The mode of attachment of DTPA, for example, is via an amide bond (as shown in the structure above) by reaction of the ϵ -amine of D-lysine with DTPA dianhydride, or via an isothioureia bonding to isothiocyanatobenzyl DTPA (with the peptide attached to R). It is known from the work of Franano et al., *Nucl. Med. Biol.* 21: 1023-34 (1994) and others that the amide bond or isothioureia bond between DTPA and ϵ -amine of lysine is inert (nonmetabolizable) in the lysosomes. It is also known that antibodies radiometalated by, for example, indium or yttrium via an aminopolycarboxylate such as DTPA as a metal chelator are residualized. This phenomenon, documented by Stein et al.

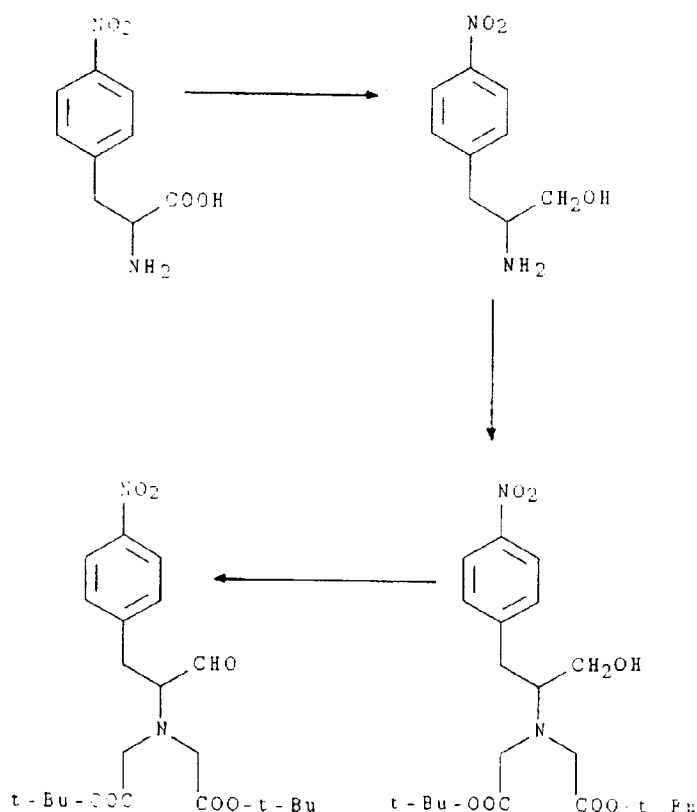
(see above) and others, is due to the hydrophilic nature of the metal chelate as well as its charge and molecular weight, which all contribute to residualization in a lysosomal compartment. This invention uses aminopolycarboxylate on an iodinated **and** nonmetabolizable peptide template as one method of producing residualizing iodine label. To this end, D-lysine, which is coupled to an aminopolycarboxylate, is elaborated on the amino end by attaching a D-tyrosine, thus producing a totally inert adduct, which when iodinated and attached to antibodies via a cross-linker at the amine terminus of the said peptide, results in a residualizing radioiodine. When radioiodinated and coupled to a lymphoma antibody LL2 the product resembles the same antibody labeled with indium-111 in terms of retention to a lymphoma cell line *in vitro*, and an enhanced retention compared to the same antibody which is conventionally radioiodinated (see Example-5).

Peptides of this category can be readily synthesized on a solid support, either manually or using an automated peptide synthesizer. The number of amino acid units can be 2-40, with the provision that the DTPA anchoring amino acid is D-lysine or D-arginine or D-ornithine, and that this amino acid is directly attached to a D-tyrosine. When the peptide contains multiple D-tyrosines (which is useful for enhancing specific activities), each tyrosine is attached to D-amino acids. The amine terminus of the peptide can be glycine or an L or D amino acid, and is attached to a cross-linker for coupling to antibodies.

SCHEME III



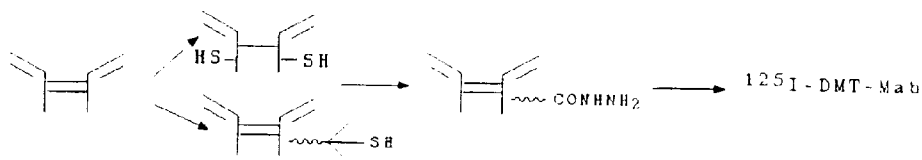
In the reaction sequence shown in SCHEME III, a substituted aminopolycarboxylate such as DTPA is used to couple radioiodine to antibody. A backbone-substituted DTPA such as 4-nitrobenzyl DTPA (structure on left in SCHEME III where $n=0,1,2$) is a logical starting point for the synthesis. A dianhydride is prepared from nitrobenzyl DTPA, and is opened with D-tyrosine under basic non-aqueous conditions in DMSO or DMF. The nitrobenzyl group in this substrate easily is converted to an isothiocyanatobenzyl group in a 2-step process of catalytic hydrogenation and reaction with thiophosgene (product structure not shown). This substrate is first radioiodinated and then coupled to antibody between pH 8-9. Although exemplified by a bifunctional DTPA as the starting material, the method is applicable to the use of bifunctional EDTA or bifunctional TTHA as a starting material.

SCHEME IV

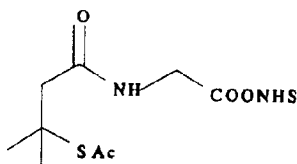
In another approach, a tyramine and an antibody-binding moiety form part of the aminopolycarboxylate structural unit. This is illustrated by the bifunctional structures N,N-bis(carboxymethyl)-N'-[2-(p-hydroxyphenyl)ethyl]-2-[p-isothiocyanatobenzyl]ethylenediamines **A** and **B** of the reaction scheme shown. Briefly, the synthesis involves elaborating 4-nitrophenylalanine by first reducing the carboxyl group to alcohol by, for example, using borane as a reducing agent, followed by dialkylation, and oxidation of the alcohol group to an aldehyde via Sloan oxidation with oxalyl chloride in DMSO followed by reductive coupling to tyramine, and finally converting the nitrobenzyl group to an isothiocyanatobenzyl group. These residues are first radioiodinated and then coupled to antibody lysine groups or to thiolated antibodies. The presence of the basic

amino groups and the carboxylic acid groups in the prepared conjugate aids residualization within the acidic lysosome environment.

SCHEME V



5 In the reaction sequence shown in SCHEME V, one or more thiol groups are introduced into an antibody such as a monoclonal antibody (Mab) by one of two illustrative methods. In the first, a disulfide bond reducing agent, such as dithiothreitol (DTT), effects either partial or
10 complete cleavage of heavy chain disulfide bonds. Alternatively, one or more thiol groups

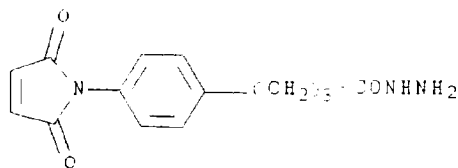


(1)

are introduced with a linker. A protected tertiary thiol is preferred, such as a succinimidyl 2-[N-(3'-methyl-3'-thioacetyl)butamidyl]acetate (1), the thioester of which
15 is then cleaved with hydroxylamine as described by Govindan et al. in *Bioconjugate Chemistry*, 7:290-297, 1996.

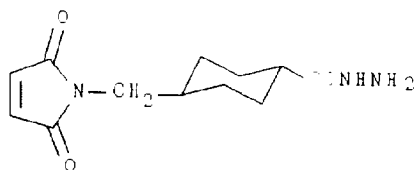
20 The resultant thiolated antibody is linked to a hydrazide using a maleimide/hydrazide conjugate, e.g.,

4-[4'-(N-maleimidyl)-phenyl]butyrylhydrazide (MPBH, 2) or 4-(N-maleimidylmethyl)cyclohexane-1-carboxyhydrazide (M_2C_2H , 3).



(2)

5

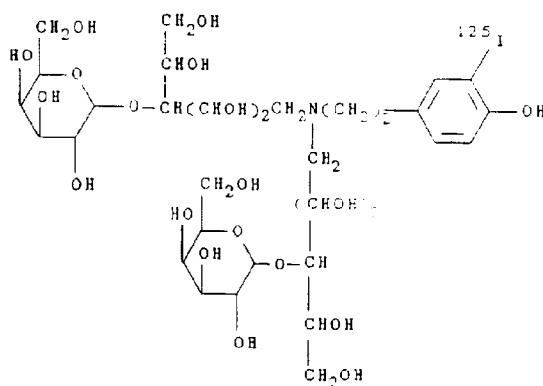


(3)

10

Finally, the hydrazide is coupled to a radioiodinated, carbohydrate, e.g., dimelibitol tyramine (DMT, 4) that has been oxidized, for example by enzymatic reaction with galactose oxidase.

15

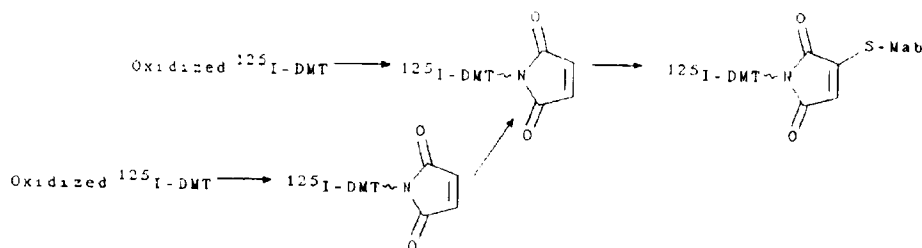


(4)

This oxidized carbohydrate optionally is further stabilized by a reductive amination reaction to form radioiodinated DMT-Mab-conjugate.

One advantage of the present invention is that, in contrast to Schiff base adducts of oxidized carbohydrates formed from simple primary amines such as those from lysine, the hydrazone conjugates according to the present invention do not require reduction of the imine (hydrazone) function for stabilization. Hydrazones are resistant to hydrolysis under physiological conditions, while Schiff bases are much more easily hydrolyzed.

SCHEME VI

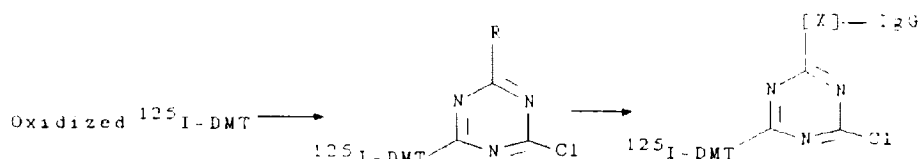


In the reaction sequence shown in SCHEME VI, an oxidized carbohydrate, e.g., DMT, couples with a maleimide/hydrazide conjugate, e.g., MPBH (2) or M₂C₂H (3) to form a maleimide dimelibiitoltyramine. A maleimide group is alternatively introduced by first reductively coupling 2-aminoethylcarbamate to oxidized dimelibiitoltyramine or oxidized melibiitoltyramine, followed by deprotection of the remaining primary amino group and its further conversion to maleimide. The tyramine residue is iodinated either before or after this reaction. One or more thiol groups are introduced to an antibody by one of two methods as described above. Finally, the maleimide is coupled to the antibody to form a stable radioiodine DMT-antibody conjugate.

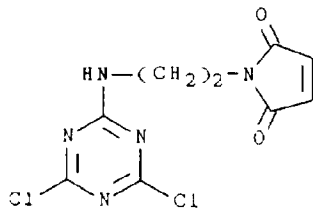
Oxidation with a periodate such as sodium or potassium periodate can create aldehyde functionalities

on the carbohydrate, although compounds containing two or more keto or hydroxyl groups attached to adjacent carbon atoms tend to cleave between these two carbons. Periodate oxidation can cause extensive isomerization and even decomposition of a carbohydrate chain. For these reasons it is preferred to oxidize carbohydrate with an enzyme such as galactose oxidase, which can introduce one aldehyde functionality into the carbohydrate without causing other structural changes.

SCHEME VII



The reaction sequence of SCHEME VII shows coupling of radiolabelled tyramine carbohydrate, such as DMT (4), or MT with a substituted cyanuric chloride (CC) via displacement of a chlorine on the cyanuric dichloride. The first chlorine of cyanuric chloride is very reactive, the second chlorine of monosubstituted CC is somewhat less reactive, while the remaining chlorine in the disubstituted CC is relatively unreactive. According to one advantageous embodiment, a monosubstituted CC is prepared under non-aqueous conditions, from equimolar quantities of CC and a maleimide-containing amine, e.g. monosubstituted CC analog (CC analog 5, below).



(5)

From the monosubstituted CC depicted above, only one chlorine is readily available for reaction with a radioiodinated carbohydrate such as I-125-DMT. Furthermore, the maleimide group, being thiol-reactive, can couple subsequently to a thiolated antibody. The high reactivity of thiol toward maleimide obviates low yield and aggregation problems that result from protracted reaction of antibody amine with DMT-derivatized CC.

Although an Iodine-125 (I-125) radioisotope exemplifies the embodiments shown in SCHEME I-VII, the methods of the present invention are applicable to any iodine isotope. I-123 is especially preferred for use in tumor imaging, Iodine-131 (I-131) is especially preferred for use in tumor therapy and I-125 is preferred for short-range detection of tumor margins, e.g. for intraoperative, intravascular or endoscopic procedures.

The incorporation of radioiodine into a peptide or carbohydrate of the present invention is carried out by an electrophilic substitution reaction. This reaction is fast and allows coupling in dilute solutions of radioiodine. The reaction generally requires oxidation of iodine ions to produce an electrophilic radioiodination reagent. Methods for oxidizing halide ions are well known in the art and are described by Wilbur (see above). Although the invention exemplifies sodium iodide/iodogen combinations, the method is not limited to this reagent combination.

Reactions of substituted cyanuric dichloride are preferably carried out at neutral pH. Neutral pH is defined as a pH between pH 4.5 and pH 9.5. A neutral pH between pH 6 and pH 8 is especially preferred for the invention.

Many different kinds of maleimide-hydrazides are known or can be made by the skilled artisan and are suitable for the present invention. Especially preferred are the two maleimide-hydrazides (2) and (3) shown above. Other maleimide-hydrazides can be synthesized from a

maleimido N-hydroxy-succinimide ester. Representative maleimido-esters useful for this purpose are: 3-maleimidobenzoic acid N-hydroxy-succinimide ester, β -maleimidobutyric acid N-hydroxysuccinimide ester, ϵ -maleimidocaproic acid N-hydroxysuccinimide ester, 4-(N-maleimidomethyl)-cyclohexane-1-carboxylic acid N-hydroxy-succinimide ester, 4-(N-maleimidomethyl-cyclohexane-1-carboxylic acid 3-sulfo-N-hydroxy-succinimide ester and β -maleimidopropionic acid N-hydroxysuccinimide ester.

Any antibody that is specific for a tumor cell surface marker is useful for the present invention. This antibody preferably has an affinity for a particular cell type that allows antibody targeting to deliver radioiodine for tumor imaging or for tumor therapy. Particularly preferred are internalizing pancarcinoma antibodies such as RS7 as described by Stein et al., *Cancer Res.* 50: 1330-36 (1990), internalizing lymphoma antibodies such as LL2 as described by Pawlak-Byczkowska et al., *Cancer Res.* 49: 4568-77 (1989) and anti-carcinoembryonic antigen antibodies such as Immu-14 as described by Hansen et al., *Cancer* 71: 3478-85 (1993). All three references are hereby incorporated by reference in their entirety. Also preferred are chimeric, humanized and human versions of antibodies and antibody fragments.

The present method is particularly well suited for coupling sulfhydryl-containing monovalent antibody fragments, e.g., Fab-SH or Fab'-SH, since they can be generated by reductive cleavage of divalent F(ab)₂ or F(ab')₂ fragments with an appropriate conventional disulfide reducing agent, e.g., cysteine, dithiothreitol, 2-mercaptoethanol, dithionite and the like. Reduction preferably is effected at pH 5.5-9.5, preferably 6.0-6.8, more preferably 6.1-6.4, e.g., in citrate, acetate or phosphate buffer, and advantageously under an inert gas atmosphere. Reduction is faster at higher pH, but reoxidation is also faster. An optimal pH is selected wherein reduction is reasonably rapid, but reoxidation,

including the formation of mixed disulfides with thiol reducing agents, is negligible. Care must also be taken to avoid overly powerful reducing agents that will reduce light/heavy chain disulfide bonds in competition with heavy/heavy chain disulfide bonds within immunoglobulin proteins. Cysteine is preferred for such disulfide reductions but other thiols having similar oxidation potentials to cysteine also can be used. The ratio of disulfide reducing agent to protein is a function of interchain disulfide bond stabilities and must be optimized for each individual case. Cleavage of $F(ab')_2$ antibody fragments is advantageously effected with 10-20 mM cysteine and a protein concentration of about 10 mg/ml.

Cleavage of divalent antibody fragments can be monitored by, for example, size exclusion HPLC, to adjust conditions so that Fab or Fab' fragments are produced to an optimum extent, while minimizing light-heavy chain cleavage. Eluate from a sizing gel column can be used directly or, alternatively, the Fab-SH or Fab'-SH solution can be kept at low temperature, e.g., in the refrigerator, for several days to several weeks, preferably at a pH of 3.5-5.5, more preferably at pH 4.5-5.0, and advantageously under an inert gas atmosphere, e.g., nitrogen or argon.

Optimum reaction conditions of time, temperature, ionic strength, pH and the like suitable for the coupling reactions of SCHEME 1, 2 and 3 can be determined by a minimum of experimentation. In fact, one principal advantage of the present invention is that the coupling reactions with maleimide and with substituted cyanuric dichloride can take place easily at neutral pH. Reaction temperature and ionic strength are likewise not critical. An important consideration is that non-extreme reaction conditions be chosen which will not denature the specific antibody used.

The invention is described further below by reference to illustrative examples.

EXAMPLESExample 1. Preparation of (BOC)Gly-D-Tyr(O-t but)-D-Lys-OH

5 Fmoc-D-Lysine(Aloc) [0.325 g; 0.72 mmol] is dissolved in 5 ml of anhydrous dichloromethane (CH_2Cl_2), and mixed with 0.55 ml of diisopropylethylamine (DIEA). The solution is then added to 0.5 g of 2-chlorotrityl chloride resin in a 20 ml vial and the contents shaken vigorously for 18 h. The reddish slurry is placed in a
10 column assembly fitted with a frit and a 3-way stopcock which can be used to either bubble nitrogen through the slurry for mixing purposes or for draining solution off the column and leaving the resin on the column. The solution is drained off, and the resin is washed with 3x
15 40 ml of CH_2Cl_2 :MeOH:DIEA (17:2:1), 3x 40 ml of CH_2Cl_2 , 2x 40 ml of DMF, 2x 40 ml of CH_2Cl_2 and 2x 40 ml of MeOH. The resin is dried under a flow of nitrogen. The Fmoc group is cleaved by adding 40 ml of 5% piperidine in 1:1 (v/v) CH_2Cl_2 -DMF for 10 minutes, draining the solution
20 off, and continuing cleavage with 20% piperidine in CH_2Cl_2 -DMF for 15 minutes. This is followed by a wash cycle with 40 ml DMF, 40 ml isopropanol(IPA), 40 ml NMP (N-methylpyrrolidone), 40 ml IPA and 4x40 ml NMP. The resin is then reacted with 1.8 mmol of activated Fmoc-D-tyrosine(O-t but) for 40 minutes. The activation is
25 carried out using 0.827 g (1.8 mmol) of Fmoc-D-tyr(O-t but), 0.269 g of HOBT in 4 ml of NMP, adding to the clear solution 0.31 ml of diisopropylcarbodiimide (DIC), and keeping at ambient temperature for 20 minutes. After
30 this period, 3.6 mmol (0.62 ml) of DIEA is added, and the reaction is continued for 25 minutes. The wash sequence, following Fmoc cleavage and subsequent wash sequence, are as described above. A second coupling using activated BOC-glycine (derived from 0.376 g or 3 mmol of Boc-glycine) is carried out in an analogous manner. The Aloc
35 group is removed using a solution of 0.1547 g of tetrakis (triphenylphosphine) palladium(0) in a mixture of CH_2Cl_2

(40 ml): AcOH (2 ml) and DIEA (5 ml), followed by the addition of 5 ml of tributyltinhydride. After the usual wash sequence, the peptide is cleaved from the resin with 10 ml of acetic acid-trifluoroethanol-CH₂Cl₂ (1:1:8 v/v).
5 The cleaved peptide solution is concentrated to 0.25 g of the title compound (gummy product). The product exhibits a single peak with a retention time of 7.10 min. on analytical reverse phase HPLC. Electrospray mass spectrum shows the M+H peak at m/e 523 (positive ion mode) and the
10 M-H at m/e 521 (negative ion mode).

Example 2. Preparation of Gly-D-Tyr-D-Lys(ITC-Bz-DTPA)-OH

0.053 g (0.1 mmol) of the product from step-1 is mixed with ITC-Bz-DTPA (81 mg of 80% DTPA content; 20% excess) in water-dioxane, and the pH is adjusted to 8.5.
15 The solution is incubated for 2.5 h at 37°C (bath). More ITC-DTPA (41 mg) is added, and the pH is readjusted to 8.56. The solution is then incubated for 2 h at the same temperature. Preparative HPLC purification on reverse phase column using a gradient elution of water (0.1% TFA)/90% acetonitrile-water (0.1% TFA) furnishes 30 mg of
20 (BOC)Gly-D-Tyr(O-tbut)-D-Lys(ITC-Bz-DTPA)-OH as a colorless solid. Analytical reverse phase HPLC shows a single peak with a retention time of 7.54 min. Mass spectrum analysis revealed a M+H peak at m/e 1063
25 (positive ion mode) and the M-H peak at m/e 1061 (negative ion mode). This material is then treated with a mixture of TFA/CH₂Cl₂/anisole for 1 h, and the BOC- and Tyr(O-tbut) protecting groups are cleaved off. The title compound is precipitated by adding the reaction mixture
30 to ethyl ether. The HPLC retention time was 5.31 min. Mass spectrum analysis showed AN M+H peak at 907, and AN M-H at 906.

Example 3. Preparation of (MCC)Gly-D-Tyr-D-Lys(ITC-Bz-DTPA)-OH

35 0.025 g (0.0138 mmol) of the product from Example-2 is dissolved in 0.5 ml of 0.1 M sodium phosphate pH 7.0.

To this, 0.03 g of commercially available sulfosuccinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)-1-carboxylate (SMCC) is added and the pH is raised to 7.17. The clear solution is stirred for 1 h. Preparative HPLC on a preparative reverse phase column using the same gradient elution as in Example-1 yields 0.0054 g of the title compound [where MCC stands for the 4-N-maleimidomethyl)-1-carbonyl moiety]. The retention time of the purified material (analytical RP column) is 6.36 minutes. Electrospray mass spectrum analysis showed an M+H peak at m/e 1126 and an M-H peak at m/e 1124.

Example 4. Radioiodination of product from Example 3, conjugations to a DTT-reduced monoclonal antibody IgG [LL2], and to a DTT-reduced monoclonal antibody IgG [RS7]

10 nanomoles of product of Example-3 is radioiodinated with 1.72 mCi of I-125-sodium iodide by an iodogen iodination method. The labeled substrate is transferred to a second vial, and treated with 60 nmol of 4-hydroxyphenylacetic acid, followed by reaction with 0.6 mg of an anti-lymphoma antibody [LL2] previously reduced with dithiothreitol to generate thiol groups by reduction of one or more interchain disulfide bonds of the antibody. After 1-2 h of reaction, the solution is made 5 mM in sodium tetrathionate, incubated for five minutes, and purified on a centrifuged size-exclusion column of Sephadex™ 50/80 in 0.1 M sodium phosphate pH 7. Based on the amount of activity placed on the column, a 37.4% recovery of radioactivity of antibody-bound material is obtained which was 95% pure as determined by size-exclusion chromatography via HPLC. The specific activity achieved in this procedure is 0.94 mCi/mg.

In a variation of this process, 10 nmol of the product of Example-3 is radioiodinated with 2.24 mCi of I-125 sodium iodide using chloramine T as oxidant for 1-2 minutes. Unused active iodine is quenched with 4-hydroxyphenylacetic acid, diluted with potassium iodide and reacted with 0.5 mg of DTT-reduced LL2 for 15-40

minutes. The work up and chromatography is as described above. This yields 41%-43% overall yield with a final specific activity in the 1.98-2.09 mCi/mg range.

5 The product of Example-3 (10 nmol) is radioiodinated with 1.46 mCi of NaI (I-125) using iodogen as oxidant, and the radioiodinated material is conjugated to DTT-reduced RS7 (0.5 mg). An overall yield (after purification) of 29.3% at a final specific activity of 1.0 mCi/mg is obtained. Analysis of the purified material
10 on analytical SEC HPLC shows >98% of radioactivity associated with the antibody.

Example 5. In vitro binding studies

The product of Example-4 is incubated with Raji cells (10⁶ cells/ml in Dulbecco's double eagle medium) in a
15 sterile incubator maintained at 37°C. After 2 h, the cells are pelleted by centrifugation, and the supernatant solution is discarded. The cells are washed three times with cold media. The washed cells are resuspended in fresh media and placed in an incubator. At various time
20 points, a known volume of the cell suspension is removed, pelleted and the activity associated with the cell pellet is determined. The control experiment involves using the same antibody labeled directly by a chloramine T procedure (negative control) or the same antibody labeled
25 with In-111 (by labeling the product of Example-3 with In-111 acetate, followed by coupling to DTT-reduced LL2 as a positive control) The product of Example-4 was found to be associated longer with the Raji cells by comparison with directly radioiodinated LL2. This
30 retention parallels the retention of In-111 on Raji cells. [% initially bound cpm retained: For I-125 labeled LL2: 94.7% (2 h), 63.8 % (26 h), 51.1% (48 h) & 35.4% (120 h); for In-111 labeled LL2: 89.2% (2 h), 68.1 % (26 h), 49.8% (48 h) & 34.1% (120 h).

35 In a similar fashion, in vitro bindings, to Calu 3 non-small lung adenocarcinoma cell line, of RS7 radioiodinated with residualizing label of this invention

(that is, the product of Example-3 radioiodinated and coupled to DTT-reduced RS7) and conventionally radioiodinated RS7 were compared. Data from this Example showed that the residualizing labe exhibited distinctly prolonged retention compared with that of the conventional iodine label.

Example 6. SCHEME IV Preparation of N,N-bis(carboxymethyl)-N'-[2-(p-hydroxyphenyl)ethyl]-2-[p-isothiocyanatobenzyl]-ethylenediamine A and the corresponding maleimide B

4-Nitrophenylalanine is reduced with borane in THF. Reaction with two equivalents of tert-butylbromoacetate and anhydrous sodium carbonate in refluxing acetonitrile furnishes a dialkylated product in 67.9% yield after flash chromatographic purification. The 400-MHz proton NMR spectrum of this product is fully consistent with the structural assignment. The intermediate (0.1 g) is oxidized in high yield to aldehyde using DMSO/oxalyl chloride at -78°C followed by treatment with triethylamine, and the purified product is reacted with tyramine in presence of sodium cyanoborohydride in aqueous methanol. This tyramine-appended intermediate (70% overall yield) is characterized by M+H peak at m/e 544 (electrospray mass spectrum, positive ion mode). Catalytic hydrogenation of the nitro group to an aniline derivative (product is characterized by mass spectrum), followed by a 2-step reaction sequence (involving deprotection of carboxyl protecting groups using hydrochloric acid, and a subsequent reaction with thiophosgene in 3 M hydrochloric acid) gives the isothiocyanate derivative A, which in turn is converted to maleimide derivative B in two steps (reaction with ethylenediamine, followed by treatment with SMCC as described in Example-3).

Example 7. Radioiodinations of lymphoma antibody (LL2) using I-125-labeled A or I-125-labeled B (A & B of SCHEME-4)

Radioiodination of 10 nmol of A (Na^{125}I /iodogen) followed by quenching of unreacted radioiodine with 40 nmol of aqueous phenol, and subsequent reaction with 1.37 mg of LL2 at pH 8-8.2 for 3 h at 37°C gives an incorporation of 32.8%. Experiments are carried out using lesser amounts of the antibody to increase the specific activity. An incorporation of 23.7% at a specific activity of 1.1 mCi/mg, and 24.1% incorporation at a specific activity of 1.4 mCi/mg are obtained. The aggregate content was as low as 2%. Using B, and reduced LL2 (reduction carried out as in Example-4), an incorporation of 28.4% at a specific activity of 0.95 mCi/mg is obtained, with negligible aggregation.

Example 8. Preparation of dimelibiiitoltyramine

The title product is prepared using 2.23 g (6.55 mmol) of melibiose, 0.089 g (0.657 mmol) of tyramine and 0.169 g (2.63 mmol) of sodium cyanoborohydride in 5 ml of borate buffer pH 9 at 65°C for 18 h. The solution is acidified to pH 4.6, and purified on a 2.5 cm (o.d.) and 10 cm height column of Dowex 50-X2 cation exchange resin packed in 0.05 M ammonium acetate pH 4.6. Elution is with the same buffer, followed by a linear gradient of 1L of water and 1L of 1 M ammonium hydroxide at a flow rate of 2-3 ml/minute. Fractions of 4 ml each are collected. Assay of fractions by UV absorbance at 280 nm gave the elution profile. The elution profile contains a single peak. Accordingly, eluate fractions 60 through 70 are pooled, evaporated and lyophilized to obtain 0.98 g of a colorless solid comprising of the title product and an inorganic salt. The content of dimelibiiitoltyrmine in an aqueous solution is determined using the absorbance value at 280 nm. The electrospray mass spectrum of the lyophilized material shows the correct M+H peak at m/e 790.

Example 9. Radioiodination of LL2 using I-125-DMT

In one experiment, 10 nmol of DMT is labeled with I-125 (iodogen method). The iodinated DMT is then oxidized with about 10 units of galactose oxidase at 30°C for 2.5 h. The oxidized ¹²⁵I-DMT is reacted with equimolar (10 nmol) of LL2 and 20 mM sodium cyanoborohydride at the same temperature for 18 h. Incorporation is 18.7%, which is reproducible (20.7% in a second run).

Example 10. In vitro binding of product of Example 9 to Raji cells

The experiment is carried out analogously to that described in Example-5, using directly radioiodinated antibody (by a chloramine-T procedure) as a control. The results revealed significant retention, on Raji cells, of the product of Example-9 on Raji cells compared to that of the control over a 170 time period.

Example 11. SCHEME I: Reaction of thiolated antibody with a maleimide-containing hydrazide and then with oxidized carbohydrate

In the first step of this scheme, IgG disulfide bond(s) are reduced with dithiothreitol. Briefly, 0.55 ml of an internalizing anti-lymphoma antibody LL2 described by Pawlak-Byczkowska, et al., Cancer Research 49: 4568-77 (1989) is mixed with an equal volume of sodium phosphate buffer at pH 7.4, 0.11 ml of 0.5 M borate buffer pH 8.5 and 6 ul of 0.4 g/ml dithiothreitol in water. The reaction mixture is mixed vortex and incubated at room temperature for 30 minutes. The thiol reduced antibody is then purified by size-exclusion chromatography by passing the reduced protein solution through a Sephadex™ 50/80 resin equilibrated in phosphate buffer at pH 7.0.

In the second step of this scheme, a hydrazide group is introduced into the LL2. Ten equivalents of hydrazide-maleimide M₂C₂H dissolved in dimethyl formamide are added to the prepared antibody solution for each SH group on

the IgG. Incubation is continued at 37°C for two hours. To quench the reaction, a 50-fold molar excess of N-ethylmaleimide is added and incubation is continued for another 30 minutes at 37°C. The treated IgG is then
5 purified by size-exclusion chromatography.

In the third step of this scheme, IgG is conjugated with dimelibiitol-^{125/131}I-tyramine. Dimelibiitol tyramine is first radioiodinated with radioactive sodium iodide using iodogen. The iodinated dimelibiitol tyramine is
10 oxidized with galactose oxidase by one of the procedures summarized by Strobel et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 240: 635-45 (1985). The treated IgG is conjugated to the aldehyde group of oxidized dimelibiitol tyramine at a 1:1 molar ratio in phosphate buffer at pH 7.7. After two
15 hours, sodium cyanoborohydride is added to a final concentration of 20 mM and the reaction mixture is incubated for an additional one hour. The conjugate that contains dimelibiitol-^{125/131}I-tyramine is again purified by size-exclusion chromatography at pH 7.4.

20 **Example 12. SCHEME I: Thiolation of antibody and subsequent coupling via a maleimide-containing hydrazide**

In the first step of this scheme, at least one thiol group is introduced into an antibody by reaction with a thiolating reagent (1). The thiolating reagent is
25 dissolved in dimethylformamide to a final dimethylformamide concentration of 5% vol/vol. The thiol content of the prepared antibody is determined by Ellman's assay. The thiolated antibody is equilibrated in phosphate buffer at pH 7.5 and then allowed to react with a four-
30 to ten-fold excess of the maleimide-hydrazide reagent M₂C₂H. After reaction between antibody and reagent MPBH, the conjugate is purified by size exclusion chromatography. The hydrazide-introduced antibody is then coupled to oxidized dimelibiitol-¹²³I-tyramine by
35 following the procedures outlined in steps two and three of Example 11 above.

Example 13. SCHEME II: Introduction of a maleimide-containing hydrazide into oxidized carbohydrate followed by coupling to antibody

In this scheme oxidized dilactitol-¹²³I-tyramine is
5 incubated with a two-fold excess of M₂C₂H in phosphate
buffer between pH 6 and pH 7 for one hour. Then the
thiolated antibody prepared as described above in Example
1 or Example 2 is added to the incubation mixture. After
10 an additional 30 minutes of incubation at ambient
temperature, iodoacetamide is added and incubated for
another 30 minutes to quench unreacted thiol. Sodium
cyanoborohydride is added to a final concentration of 10
mM and allowed to incubate for one hour. Prepared
15 antibody is purified from the final reaction mixture by
size exclusion chromatography.

Example 14. SCHEME III: Cyanuric Dichloride Coupling of Antibody with Residualizing Label

In this scheme a substituted cyanuric dichloride is
used to couple antibody to residualizing label. The
20 cyanuric dichloride derivative is dissolved in dimethyl
formamide or in dimethyl sulfoxide and then added to a
water solution of dilactitol-¹²³I-tyramine.

In the case of coupling with a cyanuric dichloride
analog, the cyanuric dichloride analog is first incubated
25 with the residualizing label for 90 minutes at 37°C.
After cooling, antibody solution in a phosphate buffer is
added and the mixture is incubated for three hours at
37°C. The pH of the antibody buffer solution is adjusted
so that the final reaction pH is between pH 7-8 when
30 coupling to antibody. The final pH is between pH 6-7 for
the case of coupling with thiolated antibody. The
antibody is purified from other reactants by size
exclusion chromatography.

For each of these examples, the conjugation
35 efficiency is determined by measuring the amount of I-123
incorporated into protein and the amount of protein
recovered. The degree of IgG aggregation is determined

by molecular size analysis of prepared IgG using analytical size exclusion HPLC or polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate.

5 The optimum amounts of residualizing agent, antibody and other reagents in these reactions are determined by varying their molar ratios and measuring the specific activities, binding affinities and amounts of conjugate formed under each reaction condition.

10 Example 15. Comparative biodistributions of lymphoma antibody LL2, labeled with residualizing I-125 label derived from product of Example-3 or with I-131 using conventional chloramine T method, in nude mice bearing Ramos human tumor xenografts.

15 Tumors were grown in 4-week old female nude mice using the Ramos tumor cell line. After two weeks tumor reach the size of about 0.1-0.2 gram. At this stage, groups of five mice were administered about 10 μ Ci each of the two iodine labels (I-125 residualizing & I-131 conventional), both contained in the same vial. The dual
20 label gives the more precise comparisons since variations of antibody dose and tumor size do not exist. Animals are sacrificed at 1 day, 3 days, 5 days, 7 days and 10 days post-administration of the labeled antibody. Various
25 organs including tumor are excised; the radioactivity associated with the organs are expressed as a percentage of injected dose per gram (% ID/g). Data obtained from this Example show prolonged retention and superior
30 tumor:non-tumor ratios of accretion for residualizing I-125 label versus conventionally prepared (CT method) I-131 label.

35 From the foregoing descriptions, one skilled in the art can easily ascertain the essential characteristics of this invention and, without departing from the spirit and scope thereof, can make various changes and modifications

of the invention to adapt it to various usages and conditions.

Claims

What is claimed is:

1. An aminopolycarboxylate-appended peptide useful for radioiodinating an antibody, comprising:
 - 5 (a) a peptide that comprises at least one D-tyrosine or tyramine, an amino terminus, a carboxy terminus formed from a D-lysine and no contiguous L-amino acids between the D-tyrosine or tyramine and the carboxy terminus;
 - 10 (b) an aminopolycarboxylate conjugated via one of its carboxylic acid groups to the peptide via an ϵ -amino group of the D-lysine to form an aminopolycarboxylate-appended peptide; and
 - 15 (c) a moiety conjugated to said aminopolycarboxylate-appended peptide and comprising an antibody binding functional group.
2. The aminopolycarboxylate-appended peptide of claim 1, further comprising a radioiodine atom covalently bound to the D-tyrosine or tyramine residue.
- 20 3. The aminopolycarboxylate-appended peptide of claim 1, wherein said functional group is capable of reacting with a sulfhydryl residue of an antibody to form a covalent bond.
- 25 4. The aminopolycarboxylate-appended peptide of claim 1, wherein said peptide contains 5-40 amino acids.
5. The radioionated aminopolycarboxylate-appended peptide of claim 2, wherein said peptide contains 5-40 amino acids.
- 30 6. The aminopolycarboxylate-appended peptide of claim 1, wherein said tyramine or D-tyrosine is directly linked to said D-lysine.

7. The aminopolycarboxylate-appended peptide of claim 1, wherein said aminopolycarboxylate is selected from the group consisting of nitrilotriacetic acid, EDTA, DTPA, TTHA and backbone-substituted derivatives of nitrilotriacetic acid, EDTA, DTPA and TTHA.

8. An aminopolycarboxylate-appended peptide useful for radioiodinating an antibody, comprising:

- (a) a peptide that comprises at least one D-tyrosine or tyramine, an amino terminus, a carboxy terminus formed from a D-amino acid and no contiguous L-amino acids between the D-tyrosine or tyramine and the carboxy terminus;
- (b) an aminopolycarboxylate conjugated via one of its amino groups to the peptide via an amide bond to a peptide carboxylic acid group or via a thiourea bond to a peptide amino acid residue to form an aminopolycarboxylate-appended peptide; and
- (c) a moiety conjugated to said aminopolycarboxylate-appended peptide and comprising an antibody binding functional group.

9. The aminopolycarboxylate-appended peptide of claim 8, wherein said aminopolycarboxylate is selected from the group consisting of nitrilotriacetic acid, EDTA, DTPA, TTHA and backbone-substituted derivatives of nitrilotriacetic acid, EDTA, DTPA and TTHA.

10. An aminopolycarboxylate conjugate useful for radioiodinating an antibody, comprising:

- (a) an aminopolycarboxylate; and
- (b) at least one D-tyrosine or tyramine residue wherein the residue is conjugated via its amino group to a carboxyl group of the aminopolycarboxylate.

11. The aminopolycarboxylate conjugate of claim 10, further comprising a radioiodine atom covalently bonded to the D-tyrosine or tyramine residue.

5 12. The aminopolycarboxylate-appended peptide of claim 10, wherein said aminopolycarboxylate is selected from the group consisting of nitrilotriacetic acid, EDTA, DTPA, TTHA and backbone-substituted derivatives of nitrilotriacetic acid, EDTA, DTPA and TTHA.

10 13. A stable oxidized disaccharide adduct useful for radioiodinating an antibody, comprising:

- (a) an oxidized disaccharide that comprises galactose and at least one carbonyl group; and
- (b) a D-tyrosine or tyramine.

15 14. The stable oxidized disaccharide adduct of claim 13, further comprising a radioiodine atom covalently bound to the D-tyrosine or tyramine.

20 15. The stable oxidized disaccharide adduct of claim 13, wherein said disaccharide is selected from the group consisting of dimelibiitoltyramine, melibiitoltyramine, melibiitol-(D)-tyrosine and dimelibiitol-(D)-tyrosine.

25 16. The stable oxidized disaccharide adduct of claim 13, further comprising an antibody binding moiety comprising a functional group selected from the group consisting of an aldehyde, an amine, an isothiocyanate, an N-hydroxysuccinimide ester, an imidate ester, a maleimide, a bromoacetamide and an iodoacetamide.

30 17. The stable oxidized disaccharide adduct of claim 13, further comprising a monosubstituted cyanuric monochloride.

18. The stable oxidized disaccharide adduct of claim 17, wherein said cyanuric monochloride is monosubstituted with a maleimide.



①⑨ **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑫ **Übersetzung der
europäischen Patentschrift**
⑨⑦ **EP 0915 710 B 1**
⑩ **DE 697 02 398 T 2**

⑤① Int. Cl. 7:
C 07 K 1/107
C 07 H 3/04
A 61 K 51/08

DE 697 02 398 T 2

②①	Deutsches Aktenzeichen:	697 02 398.2
⑧⑥	PCT-Aktenzeichen:	PCT/US97/14998
⑨⑥	Europäisches Aktenzeichen:	97 941 363.0
⑧⑦	PCT-Veröffentlichungs-Nr.:	WO 98/08548
⑧⑥	PCT-Anmeldetag:	27. 8. 1997
⑧⑦	Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung:	5. 3. 1998
⑨⑦	Erstveröffentlichung durch das EPA:	19. 5. 1999
⑨⑦	Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA:	28. 6. 2000
④⑦	Veröffentlichungstag im Patentblatt:	15. 2. 2001

③⑩ Unionspriorität:
24738 P 28. 08. 1996 US

⑦③ Patentinhaber:
Immunomedics, Inc., Morris Plains, N.J., US

⑦④ Vertreter:
Dr. Weber, Dipl.-Phys. Seiffert, Dr. Lieke, 65189
Wiesbaden

⑧④ Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU,
MC, NL, PT, SE

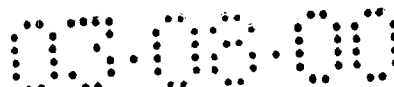
⑦② Erfinder:
GOVINDAN, V., Serengulam, Summit, US;
GRIFFITHS, L., Gary, Morristown, US

⑤④ **STABILE RADIOIODIUM-KONJUGATE UND VERFAHREN ZU DEREN HERSTELLUNG**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

DE 697 02 398 T 2

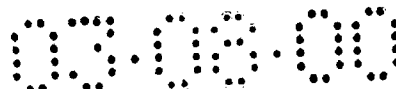


- kann das Vorhandensein eines starken Oxidations- oder Reduktionsmittels zu einer strukturellen Beeinträchtigung eines Antikörpers führen. Aus diesem Grund besteht ein alternativer Ansatz darin, ein kleines organisches Molekül zu iodieren und die reine iodierte Spezies mit Antikörper zu koppeln. N-Succinimidyl-3-(3-iodo-4-hydroxyphenyl)-propionat (Bolton-Hunter-Reagens) ist ein
- 5 Beispiel für die letztgenannte Kategorie. Diese und andere Verfahren wurden von Wilbur (Id) rezensiert.

Ein Hauptnachteil bei der Verwendung der vorgenannten Radioiodierungsschemen liegt in dem Phänomen der *in vivo* Deiodierung. Infolge von Antikörperinternalisierung und lysosomaler Prozessierung *in vivo* wird ein markiertes Protein zu kleinen Peptiden abgebaut und sein radioaktives Iod wird von der Zelle in der Form von Iodotyrosin oder als ein an ein Peptidfragment von geringem Molekulargewicht gebundenes Iod freigesetzt. Diese Erkenntnisse wurden von Geissler et al., Cancer Research 52: 2907-2915 (1992), und von Axworthy et al., J. Nucl. Med. 30: 793 (1989), berichtet. Diese *in vivo* Entfernung von radioaktivem Iod aus Zielzellen hat eine tiefgreifende Bedeutung für die Verwendung von Iodisotopen zur Radiodiagnose und Radiotherapie. Eine Unterscheidung zwischen Tumor und Nichttumor, die für Diagnose und Therapie von Bedeutung ist, und die längere Speicherung von Isotop an einer Tumorzelle, welche für Radiotherapie von Bedeutung ist, sind durch das Auftreten von *in vivo* Deiodierung stark beeinträchtigt. Dies wird vollständig klar, wenn man die achttägige Halbwertszeit von Iod-131 berücksichtigt, welches in breitem Maße für Radioimmuntherapieuntersuchungen verwendet wird. Wenn Antikörper, die mit diesem Isotop radioiodiert sind, verstoffwechselt werden und das Isotop anschließend aus den Zielzellen innerhalb der ersten 24-120 Stunden nach der Injektion des Reagenzes aus den Zellen entfernt wird, ist der Vorteil der langen Halbwertszeit dieses Isotops für die Therapie verloren. Dies bedeutet, daß die brauchbare Halbwertszeit dieses Isotops aufgrund des oben beschriebenen Nachteils von herkömmlicher Radioiodierungsschemie nicht in einer längeren tumoriziden Wirkung ausgenutzt wird.

Im Gegensatz zu diesem Nachteil herkömmlicher Chemie ist die Wirkung von *in vivo* Deiodinasen bei der Freisetzung von Iod in der Form von molekularem Iod aus der Zelle für das Problem, das Verhältnis von Ziel zu Nichtziel der Radioisotopansammlung zu optimieren, weniger signifikant. Auf diesem Gebiet Tätige haben versucht, iodierte Proteine herzustellen, die nicht durch die Wirkung von *in vivo* Deiodinasen "deiodieren", wie es von Wilbur et al., Journal of Nuclear Medicine, 30: 216-26 (1989), rezipiert wurde. Diese Versuche sind jedoch dahingehend fehlgeschlagen, eine Verbesserung der zellulären Speicherung von radioaktivem Iod zu zeigen. Der Grund für diese Fehlschläge besteht im Gegensatz zu dem, was man erwartet hat, darin, daß die metabolische Entfernung von intaktem Iodotyrosin für die Entfernung von Isotop bedeutsamer war als die Deiodierung von Tyrosin unter Freisetzung von radioaktivem Iod.

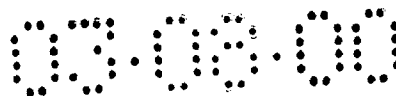
Ein Weg, die unakzeptabel schnelle Freisetzung von radioaktivem Iod aus Konjugat zu überwinden, besteht darin, Iod an nicht metabolisierbaren Kohlenwasserstoff zu binden und das erhaltene Gebilde mit Antikörpern zu konjugieren. Nach einem Antikörperabbau in einer Tumorzelle bleibt das radioaktive Iod stabil an den Kohlenwasserstoff gebunden und ist somit innerhalb



• der Zelle gefangen. Diese Kohlenwasserstoffmarkierungen, welche als "zurückbleibende Markierungen" bezeichnet werden, werden beispielhaft von Strobel et al., Arch. Biochem. Biophys., 240: 635-45 (1985), und Ali et al., Cancer Research (suppl.), 50: 783s-88s (1990), beschrieben. Jedoch haben diese Verfahren, wenn sie auf die Markierung von monoklonalen Antikörpern (Mabs) angewendet werden, einen oder beide der folgenden Nachteile: (1) Sehr geringe Ausbeuten an radioaktiver Markierung (3-6%) und (2) Bildung von Aggregaten (bis zu 20%). Geringe Konjugationsausbeute erfordert die Handhabung einer großen Menge an radioaktivem Iod, um ausreichend radioaktive Markierung in den Antikörper aufzunehmen. Dieser Ansatz verursacht Bedenken bezüglich Strahlungssicherheit sowie Verlust des größten Teils der unbrauchbaren Radioaktivität. Infolgedessen leidet die spezifische Aktivität, die durch dieses Verfahren erreicht wird. Darüber hinaus kann eine Aggregatbildung zu verminderter Tumoraufnahme und wird zu einer verstärkten Leberaufnahme führen und damit die Wirksamkeit des Verfahrens der radioaktiven Markierung beeinträchtigen. Der gesamte Vorteil der Verwendung von zurückbleibenden Markierungen für die Radioimmundetektion und die Radioimmuntherapie kann nicht realisiert werden, wenn kein Fortschritt dahingehend erfolgt, die zwei Probleme der schlechten Ausbeute der radioaktiven Markierung und der Aggregatbildung, wenn Reagenzien auf der Grundlage von Kohlenwasserstoff verwendet werden, zu begrenzen. Die Verwendung neuer Substrate und Methoden, um diese Probleme anzugehen, ist ein weiterer Gesichtspunkt dieser Erfindung.

Ein gut bekannter Ansatz für dieses Problem besteht darin, den Antikörper mit einem radioaktiven Metallion, wie Indium-111 oder ein Isotop von Yttrium, unter Verwendung eines bifunktionalen Aminopolycarboxylatliganden, wie bifunktionalem EDTA oder bifunktionalem DTPA, zu markieren. Diese radioaktiv markierten Konjugate zeigen eine lange Verweilzeit des radioaktiven Metalls in einem Tumor, wie es beispielhaft in *in vivo* Tierexperimenten von Stein et al., Cancer Research, 55: 3132-39 (1995), gezeigt wurde. Das bedeutet, daß sich radioaktive Metallionen, die mit Aminopolycarboxylaten chelatisiert sind, auch *in vivo* als zurückbleibende Markierungen verhalten. Somit trifft das Problem der Speicherung auch allgemein auf Techniken zu, die diese Markierungen verwenden.

Der Stand der Technik ist dem Problem der Speicherung von Iodmarkierungen durch Verwendung von nicht metabolisierbaren Zuckern, an welche eine iodierbare Gruppe gebunden ist, begegnet. Eine iodierbare Gruppe, wie Tyramin, wird reduktiv an den Kohlenwasserstoff gebunden, so daß dort keine metabolisierbare Peptidbindung zwischen Tyramin und dem Zuckergebilde vorhanden ist. Es gibt zwei Hauptprobleme, die mit diesen Verfahren nach dem Stand der Technik einhergehen. Diese liegen in den Antikörperbindungsstufen. Ein Verfahren, dasjenige von Strobel et al. (siehe oben), verwendet ein Kohlenwasserstoffaddukt, welches aus Lactose erhalten wird, und bindet Proteine und Antikörper an dieses, indem zuerst der Galaktoseanteil dieser Addukte mit Galaktose-Oxidase oxidiert wird. Üblicherweise wird eine schlechte Gesamtausbeute (3-6%) erhalten, wie es von Stein et al., Cancer Research, 55: 3132-3139, (1995), beschrieben ist. Weiterhin ist Lactose ein ineffizientes Substrat für Galaktose-Oxidase. Bei der Untersuchung einer Anzahl von Galaktosehaltigen Kohlenwasserstoffderivaten hinsichtlich ihrer



Eignung, von diesem Enzym oxidiert zu werden, stellten Avigad et al. (J. Biol. Chem., 237: 2736-2743, (1962)) fest, daß Lactose weniger als die halbe Affinität von D-Galaktose für Galaktose-Oxidase hatte und im Vergleich zu Galaktose 50-mal langsamer oxidiert wurde. Diese ineffiziente Stufe trägt daher zur insgesamt verminderten Radioisotopaufnahme in Antikörper bei.

Ein weiterer Ansatz, der mit der Bindung an Antikörper zu tun hat, macht keinen Gebrauch von irgendeiner speziellen Eigenschaft, wie der Fähigkeit des Kohlenwasserstoffs, von einem Enzym selektiv derivatisiert zu werden (wie Galaktose-Oxidase-Oxidation, welche einen Galaktoserest einbezieht), sondern verwendet Cyanurchlorid als Vernetzer, um den iodierten Kohlenwasserstoff und den Antikörper miteinander zu verbinden. Dieser Ansatz hat das schwerwiegende Problem, daß Antikörperaggregate erzeugt werden.

Cyanurchlorid wurde verwendet, um Konjugate zu bilden, jedoch enthält dieses Reagens leider drei reaktive Chloratome und bildet infolgedessen Aggregate. Ein weiterer an der Aggregatbildung beteiligter Faktor ist das Vorhandensein multipler Aminreste in Antikörpern, welche an das zurückbleibende Agens und/oder Bindungsreagens binden können, insbesondere mit Kohlenwasserstoff zurückhaltenden Mitteln, welche durch reduktive Aminierung an Protein binden. Diese Mehrfachbindung verursacht die Bildung von Aggregaten und führt zu einer geringen spezifischen Aktivität der radioaktiven Markierung in dem hergestellten Konjugatgemisch. Dementsprechend werden Kopplungsagenzien benötigt, die keine Aggregatbildung verursachen.

20

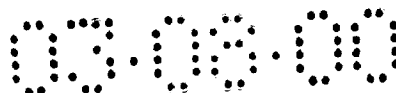
Zusammenfassung der Erfindung

Die vorliegende Erfindung löst die oben genannten Probleme durch Bereitstellung von Herstellungsverfahren und Zusammensetzungen iodierbarer Peptide, die aus nicht natürlichen D-Aminosäurekomponenten bestehen. Die radioaktiv iodierten Versionen dieser Konjugate werden zur Markierung von Antikörpern und zur Herstellung von zurückbleibenden Markierungen verwendet.

Die vorliegende Erfindung ist auch auf die Herstellung von bifunktionalen iodierbaren Aminopolycarboxylataddukten gerichtet, in denen die iodierbare Gruppe an die Aminopolycarboxylateinheit über eine nicht metabolisierbare Peptidbindung gebunden ist. Die Addukte werden radioiodiert und mit Mabs oder deren Fragmenten konjugiert und führen dabei eine zurückbleibende Markierung in biospezifische Mabs ein.

Die vorliegende Erfindung ist weiterhin auf die Ausgestaltung neuer Methoden zur Verbesserung der Ausbeuten bei der Radioiodierung monoklonaler Antikörper unter Verwendung von auf Kohlenwasserstoff basierenden Reagenzien gerichtet.

Die vorliegende Erfindung ist weiter auf die Herstellung von auf Kohlenwasserstoff basierenden Reagenzien gerichtet, welche die Qualität von zurückbleibenden Markierung-Antikörper-Konjugaten (mit minimaler Aggregation) verbessern und dabei die Ansammlung (insbesondere in der Leber) der Markierung *in vivo* in einem Nichtziel herabsetzen.

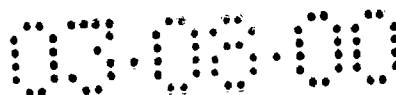


Die vorliegende Erfindung ist auch auf die einfache Bindung solcher zurückbleibender radioaktiver Iodmarkierungen an zielgerichtete Vektoren, einschließlich Proteine, wie monoklonale Antikörper, Fragmente und Konstrukte davon, gerichtet.

Bei einer Ausführungsform werden zur Markierung von Antikörpern nicht metabolisierbare und radioiodierte Peptide verwendet, so daß die Radioaktivität *in vivo* zurückgehalten wird. Diese speziell ausgestalteten hydrophilen Peptide haben vorzugsweise ein Molekulargewicht von mehr als 500 (das heißt fünf Aminosäurereste oder mehr). Besonders bevorzugt hat das Peptid ein Molekulargewicht zwischen 1.000 und 4.000 (10-40 Aminosäurereste), obwohl in manchen Fällen mehr als 40 Aminosäuren akzeptabel sind. Ein hydrophiles Peptid bedeutet in dem hierin verwendeten Zusammenhang, daß das Peptid polare Aminosäureeinheiten, die geladen sind, wie Asparaginsäure, Glutaminsäure, Lysin und Arginin, oder die polar sind, wie Serin und Threonin, umfaßt. Das Vorhandensein mehrerer hydrophiler Säuregruppen unter diesen Resten und deren nicht metabolisierbare Peptidbindungen erlauben ein Zurückhalten der radioaktiven Markierung nach einem Antikörperabbau durch Lysosome. Besonders bevorzugt sind in diesem Zusammenhang saure Aminosäurereste, wie Asparaginsäure.

D-Aminosäuren enthalten das Peptid zwischen der Stelle der Bindung des Peptids an einen Antikörper und einem radioaktiven Iod, welches an ein Tyrosin oder ein Tyramin gebunden ist. Insbesondere sind in diesem Bereich keine zwei benachbarten Aminosäuren L-Aminosäuren. Glycin ist in diesem Zusammenhang eine L-Aminosäure. Durch Verwendung von D-Aminosäuren auf diese Art und Weise können die Peptidbindungen, welche das radioaktive Iod mit dem Antikörper verbinden, in einem Lysosom nicht hydrolysiert werden.

Bei einer zweiten Ausführungsform wird ein bifunktionales Aminopolycarboxylatsystem, welches eine iodierbare Gruppe enthält, hergestellt, indem man zuerst eine Peptideinheit synthetisiert, die aus zwei unterschiedlich geschützten Aminogruppen und nicht natürlichen D-Aminosäureeinheiten in dem Peptidmer besteht. Sequentielle Verarbeitung der Aminogruppen durch Hinzufügen einer Aminopolycarboxylateinheit und anschließendes Hinzufügen eines Proteinvernetzers vervollständigt die Synthese des bifunktionalen Aminocarboxylats. Das Peptid enthält eine oder mehrere unnatürliche D-Tyrosineinheiten. Die Aminosäureeinheiten des Peptids sind über nicht metabolisierbare Amidbindungen gebunden. Die Antikörper bindende Gruppe kann ein Aminrest (für ortsspezifische Bindungen an einen oxidierten Kohlenwasserstoff von Mabs), ein Imidat oder Isothiocyanat (welches an Lysingruppen von Proteinen gebunden werden kann), Maleimid, Brom- oder Iodacetamidrest (spezifisch für Thiole an Mabs) und ähnliches sein. Die Anzahl von Aminosäureeinheiten in dem Peptid beträgt 2 bis 10, vorzugsweise 3, von denen wenigstens eine D-Tyrosin ist. Die Aminosäure(n), welche unmittelbar auf die letzte D-Tyrosineinheit folgt (folgen) und welche dazu verwendet wird (werden), Antikörper bindende Vernetzer einzuführen, kann (können) natürliche L-Aminosäure(n) sein. Die Aminopolycarboxylateinheit kann Iminodiessigsäure, Nitrilotriessigsäure, EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure), DTPA (Diethylentriamintetraessigsäure), TTHA (Triethylentetraminhexaessigsäure), DOTA (1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-N,N',N'',N'''-tetraessigsäure) oder verschiedene an der Hauptkette



- substituierte Abwandlungen davon, wie z.B. Isothiocyanatobenzyl-EDTA/DTPA/TTHA/DOA, unter vielen anderen Aminopolycarboxylaten und deren Derivaten, welche man sich einfach vorstellen kann, sein.

Bei einer dritten Ausführungsform wird das bifunktionale iodierbare Aminopolycarboxylat durch Bindung einer Tyramingruppe und einer Antikörper bindenden Gruppe an das Aminopolycarboxylat erhalten. In diesen Strukturen ist keine proteaseempfindliche Bindung enthalten. Alternativ werden Aminopolycarboxylate, die an der Hauptkette mit einer Antikörper bindenden Einheit substituiert sind, in entsprechende Dianhydride überführt, welche dann mit D-Tyrosin umgesetzt werden, um ein Gebilde zu erhalten, das zwei D-Tyrosinreste enthält. Da die Amidbindung(en) zwischen dem bifunktionalen Aminopolycarboxylat und D-Tyrosin von Proteasen nicht erkannt wird (werden), stellen diese eine andere Form von zurückbleibenden Iodmarkierungen dar.

Ein Schlüsselmerkmal in all diesen Systemen ist, daß der iodierter D-Tyrosinrest gegenüber Deiodinasen beständig ist. Diese Möglichkeit wird von Dumas et al., Biochem. Biophys. Acta, 293: 36-47 (1973), beschrieben.

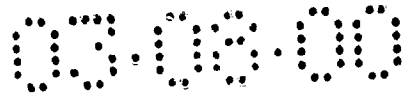
Bei einer vierten Ausführungsform wird eine auf Kohlenwasserstoff basierende zurückbleibende Markierung unter Verwendung eines Disaccharides, welches eine Galaktoseeinheit enthält und welches mit Galaktose-Oxidase leicht oxidiert werden kann, hergestellt. Diese Ausführungsform wird beispielhaft durch eine aus Melibiose erhaltene Präparation veranschaulicht. Es wird ein weiteres Beispiel geliefert, worin die auf Kohlenwasserstoff basierende zurückbleibende Markierung hergestellt wird, welche bereits eine Antikörper bindende Gruppe enthält. Noch ein weiterer Gesichtspunkt in diesem Zusammenhang umfaßt die Verwendung von Antikörpern mit angebundenem Hydrazid für eine Reaktion mit iodiertem und derivatisiertem Kohlenwasserstoff.

Bei einer fünften Ausführungsform läßt man einen radioiodierten Kohlenwasserstoff mit einem Cyanurchloridderivat reagieren, welches wiederum bereits derivatisiert ist, so daß es einen Antikörper bindenden Rest aufweist.

Die Verfahren der Erfindung bieten größere Effizienzen der Antikörpermarkierung mit zurückbleibenden Iodmarkierungen. Die Verfahren liefern auch stabile Radioiodkonjugatpräparate von höherer Qualität mit einem geringen Aggregatanteil. Andere Aufgaben und Vorteile werden anhand der nachfolgenden ausführlichen Beschreibung deutlich.

Ausführliche Beschreibung

Die vorliegende Erfindung löst das Problem der schlechten Markierungseffizienz und Aggregatbildung, von welcher in dem auf Kohlenwasserstoff basierenden Stand der Technik berichtet wird, auf zwei allgemeinen Wegen. Bei dem ersten Weg wird ein neues Verfahren bereitgestellt, das eine Oxidation des Galaktose enthaltenden Kohlenwasserstoff-Tyramin (oder D-Tyrosin-) Adduktes durch Galaktose-Oxidase erlaubt. Die Erfindung erreicht dies durch Verwendung von Melibiose als den Kohlenwasserstoff in dem Addukt. Die Affinität von Melibiose für Ga-

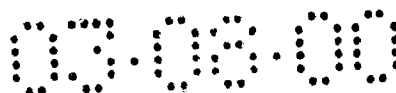


laktose-Oxidase ist fünfmal so hoch wie diejenige von Galaktose und zehnmal so hoch im Vergleich zu der Affinität von Lactose für Galaktose-Oxidase. Darüber hinaus wird Melibiose mit einer mit Galaktose vergleichbaren Rate oxidiert. Daher verbessert dieses Verfahren der Erfindung die Gesamtverfahrensausbeute, die bei der Oxidationsstufe erreicht wird. Gesamtaufnahmen von 18,7 bis 20,7% (siehe Beispiel 9) wurden für die Radioiodierung von Antikörper unter Verwendung von radioiodiertem und oxidiertem (Oxidation unter Verwendung von Galaktose-Oxidase) Dimelibiitoltyramin der vorliegenden Erfindung erzielt. Diese Aufnahmen sind fünf- bis zehnmal höher als Ausbeuten, die bei der Radioiodierung des gleichen Antikörpers beobachtet werden, wenn man radioiodiertes und oxidiertes Dilactitoltyramin verwendet. Ein Vorteil der vorliegenden Erfindung liegt in diesem Zusammenhang in der Verwendung eines Substrats (Dimelibiitoltyramin), welches von Galaktose-Oxidase vollständig oxidiert wird. Eine weitere Erfindung in diesem Zusammenhang umfaßt die Verwendung von Antikörpern mit angebundenem Hydrazid, welche zu einer verbesserten Ausbeute in der Stufe der reduktiven Kopplung von Kohlenwasserstoffligand an Proteine führt.

Der zweite Weg, wie die Erfindung die oben erwähnten Probleme des Standes der Technik löst, besteht darin, die Qualität von iodiertem Antikörperkonjugat, welches durch Cyanurchlorid vermittelte Protein-Kohlenwasserstoff-Kopplung hergestellt wird, zu verbessern. Dies wird auf zwei Weisen erreicht: (1) durch Einführung eines oder einer begrenzten Anzahl mehrerer reaktiver Hydrazidreste in einen Antikörper, der bevorzugt mit dem Kopplungsreagens reagiert, anstelle der häufigeren primären Proteinaminreste; und (2) durch Verwendung von Cyanurchloridderivaten, um Antikörper mit zurückbleibender Markierung zu koppeln. Wie es in der Erfindung verwendet wird, trägt monosubstituiertes Cyanurchlorid, hergestellt unter nicht wäßrigen Bedingungen, eine thiolreaktive Gruppe, wie Maleimid, und wird zur Kopplung an thiolhaltigen Antikörper verwendet. Das zweite Chlor dieses Cyanurdichlorids wird zur Reaktion mit einer phenolischen Hydroxylgruppe, wie derjenigen von einem Tyraminrest, verwendet, während die Thiolgruppe von thiolhaltigem Antikörper in einer nachfolgenden Stufe mit einer Maleimidgruppe reagiert. Das dritte Chlor ist unreaktiv und ist kein Faktor. Eine Aggregatbildung ist daher minimiert, und die spezifische Aktivität der hergestellten Konjugate ist verbessert.

Gemäß einem Gesichtspunkt der Erfindung wird ein Radioisotop von Iod in einer nicht metabolisierbaren Art und Weise an ein Substrat gebunden. Das Iod wird dann in der sauren Umgebung von Lysosomen nach einem Antikörperabbau gefangen. Die sich daraus ergebende verlängerte Zurückhaltung von radioaktivem Iod in einer Zielzelle, wie einer Tumorzelle, erleichtert die Zielorgandosimetrie und verbessert die Unterscheidung von Ziel zu Nicht-Ziel. Im Zusammenhang mit dem Zielen auf einen Tumor erlaubt diese Verbesserung effektivere Radiodiagnose und Radiotherapie.

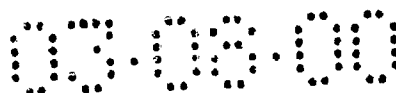
Ein weiterer Gesichtspunkt der Erfindung ist eine neue Klasse von auf Peptid basierenden zurückbleibenden Markierungen. Diese zurückbleibenden Markierungen richten sich gegen Probleme, die mit der Verwendung von auf Kohlenwasserstoff basierenden Iodmarkierungen einhergehen.



Die Verwendung von auf Peptid basierenden zurückbleibenden Markierungen umfaßt Peptide, die aus einer oder mehreren nicht natürlichen D-Tyrosineinheiten, die an andere nicht natürliche Aminosäuren gebunden sind, bestehen. Diese Peptide enthalten vorzugsweise hydrophile Aminosäuren, wie D-Asparaginsäure- und D-Glutaminsäureeinheiten, für erhöhte Hydrophilie und haben eine Größe von wenigstens fünf Aminosäureresten. Der aminoterminal Rest dieser Peptide kann eine L- oder eine D-Aminosäure sein, vorausgesetzt, daß, wenn es eine L-Aminosäure ist, diese nicht direkt an ein Tyrosin gebunden ist, und es kann für eine spätere Bindung an einen Antikörper an einen proteinbindenden Vernetzer gebunden sein. Wenn sie erst einmal radioiodiert und an Antikörper gekoppelt ist, wird die iodierte Peptideinheit in einem Zellysosome nach Anhaftung an einer Zelloberfläche durch Bindung und Verarbeitung des assoziierten Antikörpers zurückgehalten. Das Vorhandensein von nicht metabolisierbaren Amidbindungen, hydrophilen Aminosäureresten, wie geladenen Asparaginsäureresten und Glutaminsäureresten, und eine Größe von mehr als vier Aminosäureresten ermöglichen zusammen solch ein Zurückhalten. Besonders bevorzugt ist in diesem Zusammenhang die Verwendung von Asparaginsäureresten für das Peptid.

Die Struktur des Konjugates kann durch Verwendung von D-Lysin am Peptidcarboxyterminus variiert werden. Dies liefert eine ϵ -Aminogruppe für eine Bindung eines Aminopolycarboxylates, wie Nitrilotriessigsäure (NTA), Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Diethylentriaminpentaessigsäure (DTPA) oder Triethylentetraminhexaessigsäure (TTHA). Bei dieser Ausführungsform sind das ϵ -Amin am Carboxyende und das Amin am Aminoterminal auf verschiedene Weise für eine Bindung eines Aminopolycarboxylats und eines Vernetzers an bestimmten Stellen geschützt. Bei dieser Variante der Erfindung sind D-Asparaginsäuren in dem Peptid optional durch andere Aminosäuren substituiert. Noch eine weitere Variante ist die rationale Herstellung von Aminopolycarboxylatsystemen, welche eine radioiodierbare Gruppe, wie Tyramin, sowie einen Antikörper bindenden Rest enthalten.

Produkte der vorliegenden Erfindung betreffen strukturelle Gesichtspunkte, welche verbesserte Stabilität verleihen, nachdem der Antikörper aufgenommen und verarbeitet wurde. Es ist diese Antikörperverarbeitung, die zu einer verminderten Zurückhaltung von radioaktivem Iod in einem Tumor, welcher mit verinnerlichten Antikörpern vergrößert ist, führt. Unsere Erfindung richtet sich auf dieses Problem durch die Gestaltung einer nicht metabolisierbaren Peptidform, die auch an Aminopolycarboxylat und eine iodierbare Gruppe gebunden ist. Durch Bindung polarer Gruppen, wie DTPA, an D-Lysin, welches wiederum an D-Tyrosin gebunden ist, das an einen proteinbindenden Rest gekoppelt ist, stellt die Erfindung sicher, daß das gesamte Stück des Aminopolycarboxylat-D-Lysin-[I-125]-D-Tyrosin-Abschnitts nach der Antikörperverarbeitung aufgrund des Vorhandenseins von proteasebeständigen Peptidbindungen, aufgrund hydrophiler Natur und der Größe in Lysosomen gefangen wird. Dies steht im Gegensatz zu Iodotyrosin, dem Kataboliten von auf herkömmliche Weise radioiodiertem Antikörper, welches vollständig aus den Lysosomen entkommt und an den Tumorstellen eine verminderte Zurückhaltung von Radioaktivität verursacht.



Definitionen

In der folgenden Beschreibung wird eine Anzahl von Begriffen häufig verwendet. Hier werden Definitionen angegeben, um das Verständnis der Erfindung zu erleichtern.

5 **Phosphatpuffer.** Wie es hierin verwendet wird, bedeutet "Phosphatpuffer" eine wäßrige Lösung von 0,1 M Natriumphosphat, die auf einen pH-Wert zwischen 6,0 und 7,5 eingestellt ist.

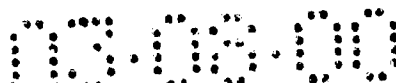
Antikörper. Wie es hierin verwendet wird, umfaßt "Antikörper" monoklonale Antikörper, wie von der Maus stammende, chimäre, humanisierte oder menschliche Antikörper, sowie Antigen bindende Fragmente davon. Solche Fragmente umfassen Fab, Fab', F(ab)₂ und F(ab')₂, denen das Fc-Fragment eines intakten Antikörpers fehlt. Solche Fragmente umfassen auch isolierte Fragmente, die aus dem variablen Bereich der leichten Kette bestehen, "Fv"-Fragmente, die aus dem variablen Bereich der schweren und leichten Kette bestehen, (sFv)₂-Fragmente (siehe z.B.: Tai et al., Cancer Research Supplement, 55: 5983-5989, 1995) und rekombinante einzelkettige Polypeptidmoleküle, in denen leichte und schwere variable Bereiche durch eine Peptidverknüpfung miteinander verbunden sind.

Radioaktives Iod-Antikörper-Konjugat. Wie es hierin verwendet wird, ist ein radioaktives Iod-Antikörper-Konjugat ein Molekül, das wenigstens eine zurückbleibende Markierung und einen Antikörper umfaßt. Ein radioaktives Iod-Antikörper-Konjugat behält die Immunreaktivität des Antikörpers, das heißt der Antikörperrest hat ungefähr die gleiche oder nur leicht verringerte Fähigkeit, nach einer Konjugation Antigen zu binden, verglichen mit einer Bindung vor einer Konjugation mit der zurückbleibenden Markierung.

Zurückbleibende Markierung. Eine "zurückbleibende Markierung" ist eine radioaktive Markierung, die kovalent an Protein gebunden ist und so ausgestaltet wurde, daß sie nach einem Abbau des Trägerproteins in Lysosomen oder einem anderen subzellulären Kompartiment eingeschlossen bleibt. Im allgemeinen werden zurückbleibende Markierungen aus Molekülen synthetisiert, die selbst in Lysosomen nicht leicht abgebaut werden. Im allgemeinen waren diese Indikatoren radioaktive Kohlenwasserstoffe oder Metallchelate von Aminopolycarboxylaten, wie DTPA.

 Jeder nicht metabolisierbare Kohlenwasserstoff ist für die vorliegende Erfindung geeignet. Dimelibitoltyramin (DMT) und Melibitoltyramin (MT) sind einige Beispiele in dieser Kategorie. Bifunktionales DTPA (oder EDTA), entweder alleine oder als ein an D-Tyrosin angebundenes Substrat, ist ein Beispiel für die Kategorie von Aminopolycarboxylaten.

Aggregat. Wie es hierin verwendet wird, ist ein "Aggregat" ein molekularer Komplex, welcher wenigstens ein weiteres Polypeptid zusätzlich zu dem gewünschten Antikörper enthält. Das weitere Polypeptid ist direkt oder indirekt über kovalente Mittel an den Antikörper gekoppelt. Beispiele für Aggregate sind Dimere, Trimere oder andere Multimere des Antikörpers. Makromolekulare Komplexe, die aus mehr als einer zurückbleibenden Markierung pro Antikörper bestehen, können als Aggregate angesehen werden, wenn die Antikörper bindende Aktivität aufgrund von übermäßiger Markierung von Antikörper mit zurückbleibender Markierung beeinträchtigt ist. Jedoch ist die Markierung eines Antikörpers mit mehreren zurückbleibenden Markierungen häufig



erwünscht als ein Mittel, die spezifische Radioaktivität des hergestellten Antikörperkonjugats zu erhöhen.

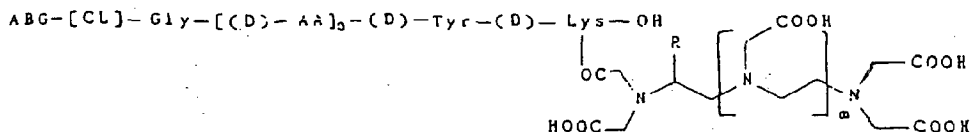
Fünf Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung sind in den nachfolgenden Schemata I bis VII gezeigt und werden nacheinander beschrieben.

SCHEMA I



worin m und n jeweils ganze Zahlen sind und $m + n = 4 - 40$, AA eine Aminosäure repräsentiert, D eine D-Aminosäure bezeichnet, CL ein Vernetzer ist und ABG eine funktionale Gruppe für eine kovalente Bindung an einen Antikörper ist. Die Ausgestaltung eines Peptids, welches einen oder mehrere D-Tyrosinreste, eine oder mehrere hydrophile Aminosäuren, wie D-Asparaginsäure, und andere Aminosäuren enthält, erhält man unter Verwendung eines Harzes. Die mit Fmoc geschützte erste Aminosäure (wahlweise als D-Lysin dargestellt) ist über ihr Carboxylende an einem Harzträger, wie einem solchen aus einem Chlortritylchloridharz, verankert. Das Peptid wird durch sequentielles Hinzufügen von Aminosäuren bearbeitet, jedes Amin wird durch eine Fmoc-Gruppe geschützt, und die Carbonsäure wird aktiviert. Nach Ausbildung jeder Amidbindung wird die Fmoc-Gruppe entfernt. Dieses Entfernen erlaubt eine Bindung an die nächste carboxylaktivierte, durch Fmoc geschützte D-Aminosäure. Das Zusammenfügen von Peptiden ist somit ein richtungsbetriebenes Verfahren. Nach Freisetzung des fertigen Peptids von dem festen Träger wird der Aminoterminus an einen geeigneten heterobifunktionalen oder homobifunktionalen Vernetzer gebunden. Viele dieser Vernetzer sind handelsüblich erhältlich. Eine oder mehrere hydrophile Aminosäuren, wie Asparaginsäure, werden eingeführt, um die Hydrophilie des Peptids zu erhöhen. Das so gebildete Peptid hat eine Mindestgröße von 5 Aminosäuren. Ein gemäß der Erfindung hergestelltes stoffwechselstabiles, D-Tyrosin-haltiges, hydrophiles Peptid ist als eine zurückbleibende Iodmarkierung geeignet.

SCHEMA II



Eine Variante des oben beschriebenen Gegenstandes besteht darin, ein Peptid herzustellen, das an seinem Carboxyterminus ein D-Lysin enthält, und die ϵ -Aminogruppe dieses Lysins an ein Aminopolycarboxylat, wie z.B. EDTA, DTPA und ähnliches, zu binden. In der in Schema II gezeigten allgemeinen Struktur ist m eine ganze Zahl mit einem Wert von 0, 1 oder 2. In dem Peptidbereich bezeichnet der Buchstabe D eine D-Aminosäure, AA steht für Aminosäure, und n

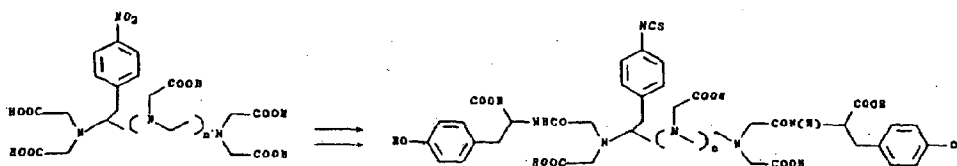


ist eine ganze Zahl von 2 bis 40. Der Aminoterminus, der hier als Glycin gezeigt ist, ist an einen Vernetzer CL gebunden, welcher in einer funktionalen Gruppe ABG für kovalente Bindungen an Antikörper endet. Letztere kann jede proteinbindende Gruppe sein, wie ein Maleimid, Haloacetamid, Isothiocyanat, Succinimidester, Imidatester und ähnliches. Der Substituent R in dem Aminopolycarboxylat ist Wasserstoff oder eine Gruppe, wie 4-Isothiocyanatobenzyl, an welche der Peptidabschnitt gebunden werden kann. Die Art und Weise der Bindung von DTPA erfolgt z.B. über eine Amidbindung (wie es in der obigen Struktur gezeigt ist) durch Umsetzung des ϵ -Amins von D-Lysin mit DTPA-Dianhydrid oder über eine Isothioharnstoffbindung an Isothiocyanatobenzyl-DTPA (wobei das Peptid an R gebunden ist). Aus der Arbeit von Franano et al., Nucl. Med. Biol. 21: 1023-34 (1994), und anderen ist bekannt, daß die Amidbindung oder Isothioharnstoffbindung zwischen DTPA und dem ϵ -Amin von Lysin in den Lysosomen inert (nicht metabolisierbar) ist. Es ist auch bekannt, daß Antikörper, die radiometalliert sind, z.B. durch Indium oder Yttrium über ein Aminopolycarboxylat, wie DTPA, als Metallchelator, zurückbleibend sind. Dieses Phänomen, welches von Stein et al. (siehe oben) und anderen beschrieben ist, beruht auf der hydrophilen Natur des Metallchelates sowie seiner Ladung und seinem Molekulargewicht, die alle zu einem Zurückbleiben in einem lysosomalen Kompartiment beitragen. Diese Erfindung verwendet Aminopolycarboxylat an einer iodierbaren und nicht metabolisierbaren Peptidform als ein Verfahren zur Herstellung einer zurückbleibenden Iodmarkierung. An dieser Stelle wird D-Lysin, welches an ein Aminopolycarboxylat gebunden ist, am Aminoende durch Anfügen eines D-Tyrosins überarbeitet, wodurch ein vollständig inertes Addukt hergestellt wird, welches, wenn es iodiert und über einen Vernetzer an dem Aminoterminus dieses Peptids an Antikörper gebunden ist, ein zurückbleibendes radioaktives Iod liefert. Wenn es radioiodiert und an einen Lymphoma-Antikörper LL2 gekoppelt ist, gleicht das Produkt in Bezug auf eine Zurückhaltung einer Lymphoma-Zelllinie *in vitro* dem gleichen Antikörper, der mit Indium-111 markiert ist, und zeigt eine bessere Zurückhaltung, verglichen mit dem gleichen Antikörper, welcher auf herkömmliche Weise radioiodiert ist (siehe Beispiel 5).

Peptide dieser Kategorie können einfach an einem festen Träger synthetisiert werden, entweder manuell oder unter Verwendung eines automatischen Peptidsynthetisierers. Die Anzahl an Aminosäureeinheiten kann 20 bis 40 betragen, mit der Vorgabe, daß die DTPA verankernde Aminosäure D-Lysin oder D-Arginin oder D-Ornithin ist und daß diese Aminosäure direkt an ein D-Tyrosin gebunden ist. Wenn das Peptid mehrere D-Tyrosine enthält (was zur Verstärkung spezifischer Aktivitäten geeignet ist), ist jedes Tyrosin an D-Aminosäuren gebunden. Der Aminoterminus des Peptids kann Glycin oder eine L- oder D-Aminosäure sein und ist für eine Kopplung an Antikörper an einen Vernetzer gebunden.

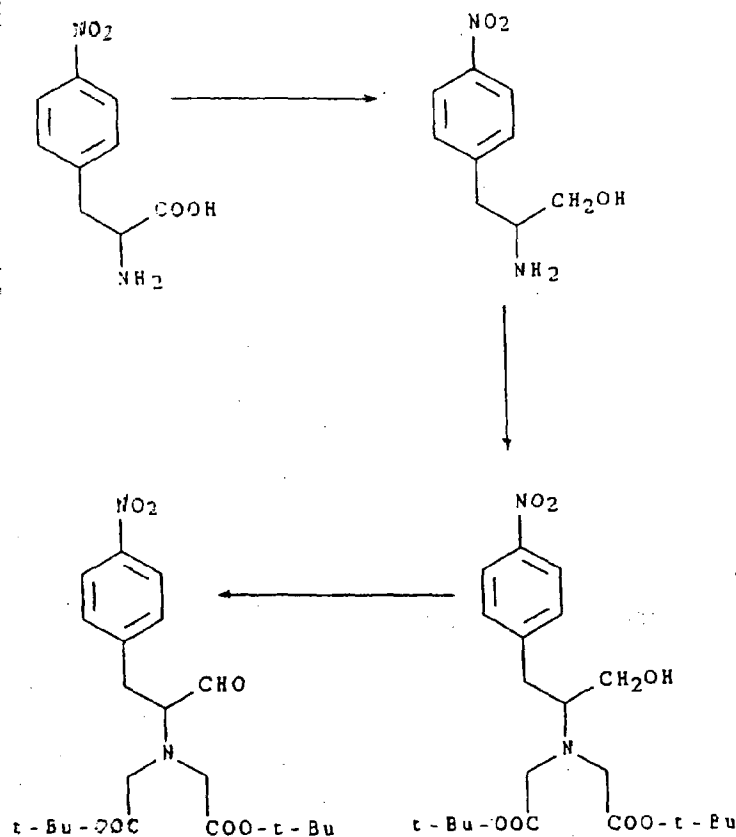
35

SCHEMA III



In der in Schema III gezeigten Reaktionssequenz wird substituiertes Aminopolycarboxylat, wie DTPA, verwendet, um radioaktives Iod an einen Antikörper zu binden. Ein an der Hauptkette substituiertes DTPA, wie 4-Nitrobenzyl-DTPA (linke Struktur in Schema III, wobei $n = 0, 1, 2$), ist ein logischer Ausgangspunkt für die Synthese. Aus Nitrobenzyl-DTPA wird ein Dianhydrid hergestellt und mit D-Tyrosin unter basischen nicht wässrigen Bedingungen in DMSO oder DMF geöffnet. Die Nitrobenzylgruppe in diesem Substrat wird leicht in eine Isothiocyanatobenzylgruppe in einem Zweistufenverfahren von katalytischer Hydrierung und Umsetzung mit Thiophosgen überführt (Struktur des Produktes ist nicht gezeigt). Dieses Substrat wird zuerst radioiodiert und anschließend zwischen pH 8-9 an Antikörper gebunden. Obwohl es durch ein bifunktionales DTPA als Ausgangsmaterial veranschaulicht ist, ist das Verfahren auf die Verwendung von bifunktionalem EDTA oder bifunktionalem TTHA als Ausgangsmaterial anwendbar.

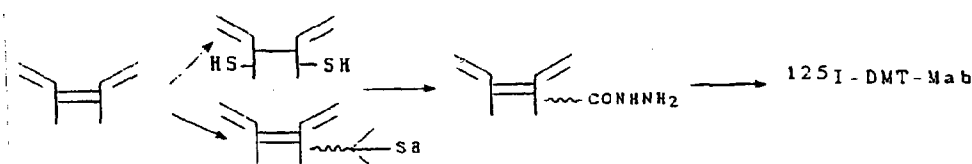
SCHEMA IV



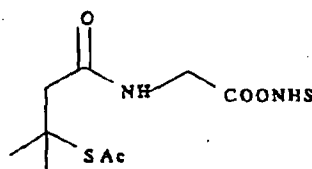
In einem weiteren Ansatz bilden ein Tyramin und ein Antikörper bindender Rest einen Teil der strukturellen Aminopolycarboxylateinheit. Dies ist durch die bifunktionalen Strukturen N,N-Bis-(Carboxymethyl)-N'-[2-(p-hydroxyphenyl)-ethyl]-2-[p-isothiocyanatobenzyl]-ethylendiamine A

und B des gezeigten Reaktionsschemas erläutert. Kurz gesagt umfaßt die Synthese die Bearbeitung von 4-Nitrophenylalanin, indem zuerst die Carboxylgruppe zu Alkohol reduziert wird, indem man z.B. Boran als ein Reduktionsmittel verwendet, gefolgt von Dialkylierung und Oxidation der Alkoholgruppe zu einem Aldehyd über Swern-Oxidation mit Oxalylchlorid in DMSO, gefolgt von reaktiver Bindung an Tyramin und schließlichem Umsetzen der Nitrobenzylgruppe zu einer Isothiocyanatobenzylgruppe. Diese Gruppen werden zuerst radioiodiert und anschließend an Antikörper-Lysin-Gruppen oder an thiolhaltige Antikörper gebunden. Die Gegenwart der basischen Aminogruppen und der Carbonsäuregruppen in dem hergestellten Konjugat fördert ein Zurückbleiben in der sauren Lysosomumgebung.

SCHEMA V



In der in Schema V gezeigten Reaktionssequenz werden eine oder mehrere Thiolgruppen in einen Antikörper, wie einen monoklonalen Antikörper (Mab) durch ein oder zwei anschauliche Verfahren eingeführt. Bei dem ersten bewirkt ein Disulfidbindungen reduzierendes Mittel, wie Dithiothreitol (DTT), entweder eine teilweise oder vollständige Spaltung von Disulfidbindungen der schweren Kette. Alternativ werden eine oder mehrere Thiolgruppen

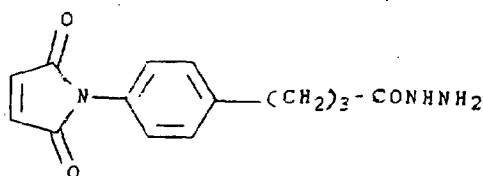


(1)

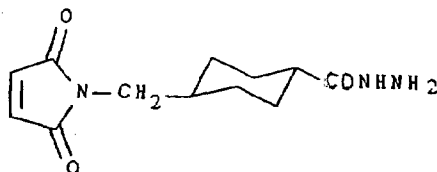
mit einem Verbindungsstück eingeführt. Bevorzugt ist ein geschütztes tertiäres Thiol, wie ein Succinimidyl-2-[N-(3'-methyl-3'-thioacetyl)-butamidyl]-acetat (1), dessen Thioester anschließend mit Hydroxylamin gespalten wird, wie es von Govindan et al. in Bioconjugate Chemistry, 7: 290-297, 1996, beschrieben ist.

Der erhaltene, mit Thiogruppen versehene Antikörper wird mit einem Hydrazid verbunden unter Verwendung eines Maleimid/Hydrazid-Konjugates, z.B. 4-[4'-(N-Maleimidyl)-phenyl]-butyrylhydrazid (MPBH, 2) oder 4-(N-Maleimidylmethyl)-cyclohexan-1-carboxyhydrazid ($\text{M}_2\text{C}_2\text{H}$, 3).

03.08.00

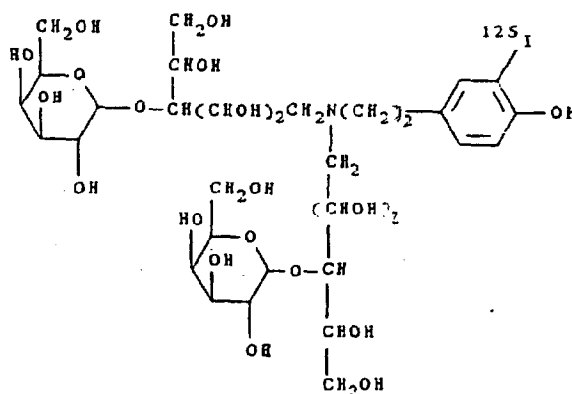


(2)



(3)

Schließlich wird das Hydrazid an einen radioiodierten Kohlenwasserstoff, z.B. Dimelibiotyramin (DMT, 4), der z.B. durch enzymatische Reaktion mit Galaktose-Oxidase oxidiert wurde, gebunden.

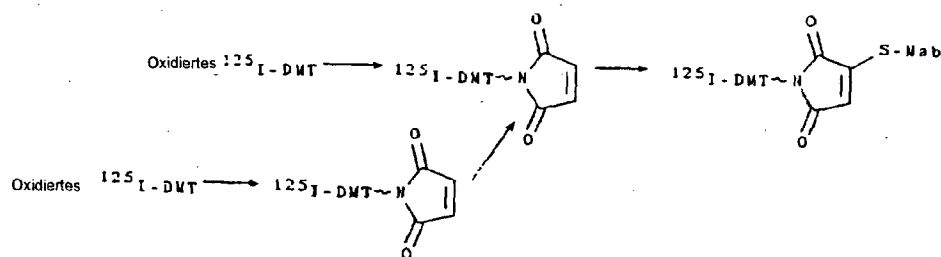


(4)

Dieser oxidierte Kohlenwasserstoff wird wahlweise durch eine reduktive Aminierungsreaktion unter Bildung eines radioiodierten DMT-Mab-Konjugates weiter stabilisiert.

Ein Vorteil der vorliegenden Erfindung besteht darin, daß im Gegensatz zu Schiff-Basen-Addukten von oxidierten Kohlenwasserstoffen, die aus einfachen primären Aminen, wie solchen von Lysin, gebildet wurden, die Hydrazonkonjugate gemäß der vorliegenden Erfindung keine Reduktion der Imin-(Hydrazon) Funktion zur Stabilisierung erfordern. Hydrazone sind beständig gegenüber Hydrolyse unter physiologischen Bedingungen, wogegen Schiff-Basen viel leichter hydrolysiert werden.

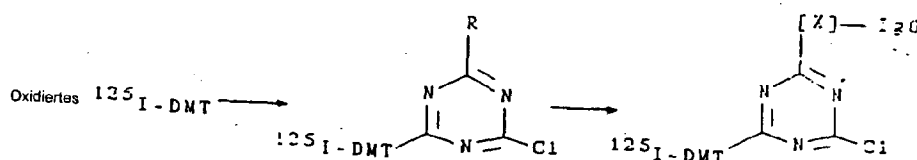
SCHEMA VI



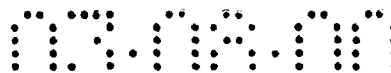
In der in Schema VI gezeigten Reaktionssequenz bindet ein oxidiertes Kohlenwasserstoff, z.B. DMT, an ein Maleimid/Hydrazid-Konjugat, z.B. MPBH (2) oder $\text{M}_2\text{C}_2\text{H}$ (3), unter Bildung eines Maleimid-Dimelibitoltyramins. Alternativ wird eine Maleimidgruppe eingeführt, indem man zuerst 2-Aminoethylcarbamate an oxidiertes Dimelibitoltyramin oder oxidiertes Melibitoltyramin reduktiv bindet, gefolgt von einer Schutzgruppenentfernung der verbleibenden primären Aminogruppe und deren weiterer Umsetzung zu Maleimid. Die Tyramingruppe wird entweder vor oder nach dieser Reaktion iodiert. Eine oder mehrere Thiolgruppen werden durch eines von zwei Verfahren, wie sie oben beschrieben sind, in einen Antikörper eingeführt. Schließlich wird das Maleimid unter Bildung eines stabilen radioaktives Iod-DMT-Antikörper-Konjugats an den Antikörper gebunden.

Oxidation mit einem Periodat, wie Natrium- oder Kaliumperiodat, kann an dem Kohlenwasserstoff Aldehydfunktionalitäten erzeugen, obwohl Verbindungen, die zwei oder mehr Keto- oder Hydroxylgruppen, gebunden an benachbarte Kohlenstoffatome, enthalten, dazu neigen, zwischen diesen zwei Kohlenstoffen zu spalten. Periodatoxidation kann eine übermäßige Isomerisierung und sogar einen Abbau einer Kohlenwasserstoffkette bewirken. Aus diesen Gründen ist es bevorzugt, Kohlenwasserstoff mit einem Enzym, wie Galaktose-Oxidase, welches eine Aldehydfunktionalität in den Kohlenwasserstoff einführen kann, ohne andere strukturelle Veränderungen zu bewirken, zu oxidieren.

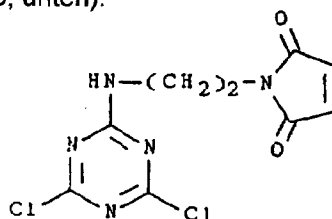
SCHEMA VII



Die Reaktionssequenz aus Schema VII zeigt die Bindung von radioaktiv markiertem Tyraminkohlenwasserstoff, wie DMT (4) oder MT, an ein substituiertes Cyanurchlorid (CC) durch Austausch eines Chlors an dem Cyanurchlorid. Das erste Chloratom von Cyanurchlorid ist sehr reaktiv, das zweite Chloratom von monosubstituiertem CC ist etwas weniger reaktiv, wogegen



das verbleibende Chloratom in dem disubstituierten CC relativ unreaktiv ist. Gemäß einer vorteilhaften Ausführungsform wird ein monosubstituiertes CC unter nicht wäßrigen Bedingungen aus equimolaren Mengen CC und einem maleimidhaltigen Amin hergestellt, z.B. ein monosubstituiertes CC-Analoges (CC-Analoges 5, unten).



(5)

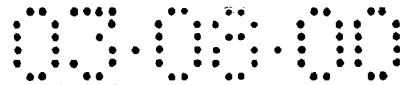
Von dem oben gezeigten monosubstituierten CC ist nur ein Chloratom vollständig für eine Reaktion mit einem radioiodierten Kohlenwasserstoff, wie I-125-DMT verfügbar. Weiterhin kann die Maleimidgruppe, welche thiolreaktiv ist, anschließend an einen thiolhaltigen Antikörper binden. Die hohe Reaktivität von Thiol gegenüber Maleimid wirkt einer niedrigen Ausbeute und Aggregationsproblemen entgegen, die aus einer verlängerten Reaktion von Antikörperamin mit DMT-derivatisiertem CC resultieren.

Obwohl ein Iod-125 (I-125) Radioisotop die in den Schemata I-VII gezeigten Ausführungsformen veranschaulicht, sind die Verfahren der vorliegenden Erfindung auf jedes Iodisotop anwendbar. I-123 ist für eine Verwendung bei der Tumorbildung besonders bevorzugt, Iod-131 (I-131) ist für eine Verwendung bei der Tumorthherapie besonders bevorzugt, und I-125 ist für eine Detektion im kurzen Bereich von Tumorrändern, z.B. für intraoperative, intravaskuläre oder endoskopische Verfahren, bevorzugt.

Die Aufnahme von radioaktivem Iod in ein Peptid oder einen Kohlenwasserstoff der vorliegenden Erfindung wird mittels einer elektrophilen Substitutionsreaktion durchgeführt. Diese Reaktion ist schnell und erlaubt eine Bindung in verdünnten Lösungen von radioaktivem Iod. Die Reaktion erfordert im allgemeinen eine Oxidation von Iodionen, um ein elektrophiles Radioiodierungsreagens herzustellen. Verfahren zur Oxidation von Halogenidionen sind auf dem Gebiet gut bekannt und werden von Wilbur (siehe oben) beschrieben. Obwohl die Erfindung Natrium-Iod/Iodogen-Kombinationen beispielhaft nennt, ist das Verfahren nicht auf diese Reagenzienkombination beschränkt.

Reaktionen von substituiertem Cyanurdichlorid werden vorzugsweise in dem pH-Bereich von 4,5 bis 9,5 durchgeführt, wobei für die Erfindung ein pH im Bereich von 6 bis 8 besonders bevorzugt ist.

Viele verschiedene Arten von Maleimid-Hydraziden sind bekannt oder können vom Fachmann hergestellt werden und sind für die vorliegende Erfindung geeignet. Besonders bevorzugt sind die zwei oben gezeigten Maleimid-Hydrazide (2) und (3). Andere Maleimid-Hydrazide können aus einem Maleimido-N-Hydroxy-Succinimidester synthetisiert werden. Stellvertretende Maleimidoester, die für diesen Zweck geeignet sind, sind: 3-Maleimidobenzoessäure-N-hydroxy-succinimidester, β -Maleimidobuttersäure-N-hydroxysuccinimidester, ϵ -Maleimidocaprinsäure-N-

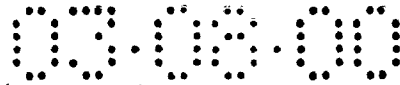


hydroxysuccinimidester, 4-(N-Maleimidomethyl)-cyclohexan-1-carbonsäure-N-hydroxysuccinimidester, 4-(N-Maleimidomethyl)-cyclohexan-1-carbonsäure-3-sulfo-N-hydroxysuccinimidester und β -Maleimidopropionsäure-N-hydroxysuccinimidester.

Jeder Antikörper, der für einen Tumorzellenoberflächenmarker spezifisch ist, ist für die vorliegende Erfindung geeignet. Dieser Antikörper hat vorzugsweise eine Affinität für einen bestimmten Zelltyp, was eine Antikörperausrichtung erlaubt, um radioaktives Iod für eine Tumorbildung oder zur Tumorthherapie zuzuführen. Besonders bevorzugt sind internalisierende Pankarzinom-Antikörper, wie RS7, wie sie von Stein et al., Cancer Res. 50: 1330-36 (1990), beschrieben sind, internalisierende Lymphoma-Antikörper, wie LL2, wie sie von Pawlak-Byczkowska et al., Cancer Res. 49: 4568-77 (1989), beschrieben sind, und anti-karzinomembryonisches Antigen-Antikörper, wie Immu-14, wie sie von Hansen et al., Cancer 71: 3478-85 (1993), beschrieben sind. Alle drei Literaturstellen sind hiermit durch Bezugnahme in ihrer Gesamtheit enthalten. Ebenfalls bevorzugt sind chimäre, humanisierte und menschliche Versionen von Antikörpern und Antikörperfragmenten.

Die vorliegende Erfindung ist insbesondere gut geeignet zur Kopplung von Sulfhydryl enthaltenden monovalenten Antikörperfragmenten, z.B. Fab-SH oder Fab'-SH, da diese durch reduktive Spaltung von divalenten $F(ab)_2$ - oder $F(ab')_2$ -Fragmenten mit einem geeigneten herkömmlichen Disulfid reduzierenden Mittel, z.B. Cystein, Dithiothreitol, 2-Mercaptoethanol, Dithionit und ähnlichem, hergestellt werden können. Reduktion wird vorzugsweise bei pH 5,5 bis 9,5, vorzugsweise 6,0 bis 6,8, besonders bevorzugt 6,1 bis 6,4, z.B. in Citrat-, Acetat- oder Phosphatpuffer und vorteilhafterweise unter einer Inertgasatmosphäre erwirkt. Die Reduktion ist bei höherem pH-Wert schneller, jedoch ist auch die Rückoxidation schneller. Es wird ein optimaler pH-Wert ausgewählt, bei dem die Reduktion geeignet schnell ist, jedoch die Rückoxidation, einschließlich der Bildung von gemischten Disulfiden mit Thiol reduzierenden Mitteln, vernachlässigbar ist. Es ist auch darauf zu achten, übermäßig starke Reduktionsmittel zu vermeiden, die Disulfidbindungen zwischen leichten und schweren Ketten in Konkurrenz zu Disulfidbindungen zwischen schweren und schweren Ketten reduzieren. Cystein ist für solche Disulfidreduktionen bevorzugt, jedoch können auch andere Thiole mit ähnlichen Oxidationspotentialen wie Cystein verwendet werden. Das Verhältnis von Disulfid reduzierendem Mittel zu Protein ist eine Funktion der Zwischenkettendisulfidbindungsstabilitäten und muß für jeden einzelnen Fall optimiert werden. Spaltung von $F(ab')_2$ -Antikörperfragmenten wird vorteilhafterweise mit 10 bis 20 mM Cystein und einer Proteinkonzentration von etwa 10 mg/ml erwirkt.

Spaltung von divalenten Antikörperfragmenten kann z.B. durch Größenausschluß-HPLC verfolgt werden, um die Bedingungen so einzustellen, daß Fab- oder Fab'-Fragmente in einem optimalen Ausmaß hergestellt werden, während Spaltung von leichter und schwerer Kette minimiert wird. Das Eluat von einer kalibrierenden Gelsäule kann direkt eingesetzt werden, oder alternativ kann die Fab-SH- oder Fab'-SH-Lösung bei niedriger Temperatur, z.B. im Kühlschrank, für mehrere Tage bis mehrere Wochen, vorzugsweise bei einem pH-Wert von 3,5 bis 5,5, beson-



ders bevorzugt bei pH 4,5 bis 5,0, und vorteilhafterweise unter einer Inertgasatmosphäre, z.B. Stickstoff oder Argon, aufbewahrt werden.

Optimale Reaktionsbedingungen für Zeit, Temperatur, Ionenstärke, pH-Wert und ähnlichem, welche für die Bindungsreaktionen der Schemata I, II und III geeignet sind, können durch ein Minimum an Experimentieren bestimmt werden. Tatsächlich besteht ein grundsätzlicher Vorteil der vorliegenden Erfindung darin, daß die Bindungsreaktionen mit Maleimid und mit substituiertem Cyanurdichlorid leicht bei neutralem pH-Wert stattfinden können. Reaktionstemperatur und Ionenstärke sind in gleicher Weise nicht kritisch. Eine wichtige Erwägung ist, daß nicht extreme Reaktionsbedingungen gewählt werden, die den verwendeten spezifischen Antikörper nicht denaturieren.

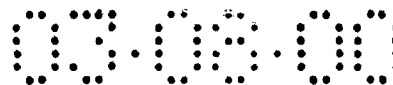
Die Erfindung wird nachfolgend unter Bezugnahme auf erläuternde Beispiele weiter beschrieben.

BEISPIELE

15

Beispiel 1. Herstellung von (BOC)Gly-D-Tyr(O-t but)-D-Lys-OH

Fmoc-D-Lysin (Aloc) [0,325 g; 0,72 mmol] wird in 5 ml wasserfreiem Dichlormethan (CH_2Cl_2) gelöst und mit 0,55 ml Diisopropylethylamin (DIEA) gemischt. Die Lösung wird anschließend zu 0,5 g 2-Chlortritylchloridharz in einem 20 ml Reaktionsgefäß gegeben und der Inhalt für 18 Stunden heftig geschüttelt. Die rötliche Masse wird in eine Säulenordnung gegeben, die mit einer Fritte und mit einem Dreiwegehahn ausgestattet ist, welcher dazu verwendet werden kann, um entweder zum Mischen Stickstoff durch die Masse hindurchsprudeln zu lassen oder um Lösung aus der Säule abfließen zu lassen und das Harz in der Säule zurückzulassen. Die Lösung wird abfließen gelassen und das Harz mit 3 x 40 ml CH_2Cl_2 :MeOH:DIEA (17:2:1), 3 x 40 ml CH_2Cl_2 , 2 x 40 ml DMF, 2 x 40 ml CH_2Cl_2 und 2 x 40 ml MeOH gewaschen. Das Harz wird unter einem Stickstoffstrom getrocknet. Die Fmoc-Gruppe wird gespalten, indem man 40 ml 5% Piperidin in 1:1 (v/v) CH_2Cl_2 -DMF für 10 Minuten hinzugibt, die Lösung ablaufen läßt und die Spaltung mit 20% Piperidin in CH_2Cl_2 -DMF für 15 Minuten fortsetzt. Dem folgt ein Waschzyklus mit 40 ml DMF, 40 ml Isopropanol (IPA), 40 ml NMP (N-Methyl-Pyrrolidon), 40 ml IPA und 4 x 40 ml NMP. Das Harz wird anschließend mit 1,8 mmol aktiviertem Fmoc-D-Tyrosin (O-t but) für 40 Minuten umgesetzt. Die Aktivierung wird unter Verwendung von 0,827 g (1,8 mmol) Fmoc-D-tyr (O-t but), 0,269 g HOBT in 4 ml NMP unter Zugabe von 0,31 ml Diisopropylcarbodiimid (DIC) zu der klaren Lösung und Halten bei Raumtemperatur für 20 Minuten durchgeführt. Nach diesem Zeitraum werden 3,6 mmol (0,62 ml) DIEA zugegeben und die Reaktion für 25 Minuten fortgesetzt. Die Waschsequenz, die folgende Fmoc-Spaltung und die anschließende Waschsequenz sind oben beschrieben. Eine zweite Bindung unter Verwendung von aktiviertem BOC-Glycin (erhalten aus 0,376 g oder 3 mmol BOC-Glycin) wird in analoger Art und Weise durchgeführt. Die Aloc-Gruppe wird unter Verwendung einer Lösung von 0,1547 g Tetrakis-(Triphenylphosphin)-Palladium (0) in einer Mischung aus CH_2Cl_2 (40 ml): AcOH (2 ml) und DIEA (5 ml) entfernt, gefolgt von der Zuga-



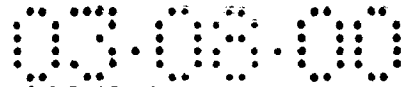
be von 5 ml Tributylzinnhydrid. Nach der üblichen Waschsequenz wird das Peptid mit 10 ml Essigsäure-Trifluorethanol- CH_2Cl_2 (1:1:8 v/v) von dem Harz abgespalten. Die Lösung des gespaltenen Peptids wird auf 0,25 g der Titelverbindung (gummiartiges Produkt) konzentriert. Das Produkt weist ein einzelnes Maximum mit einer Verweilzeit von 7,10 min. an einer analytischen Phasenumkehr-HPLC auf, und das Elektrospray-Massenspektrum zeigt das M+H Maximum bei m/e 523 (positiver Ionenmodus) und das M-H Maximum bei m/e 521 (negativer Ionenmodus).

Beispiel 2. Herstellung von Gly-D-Tyr-D-Lys(ITC-Bz-DTPA)-OH

0,053 g (0,1 mmol) des Produktes aus Stufe 1 werden mit ITC-Bz-DTPA (81 mg mit 80% DTPA-Gehalt; 20% Überschuß) in Wasser-Dioxan gemischt und der pH-Wert auf 8,5 eingestellt. Die Lösung wird für 2,5 Stunden bei 37°C (Bad) inkubiert. Es wird mehr ITC-DTPA (41 mg) zugegeben, und der pH-Wert wird auf 8,56 erneut eingestellt. Die Lösung wird anschließend für 2 Stunden bei der gleichen Temperatur inkubiert. Präparative HPLC-Reinigung an einer Phasenumkehrsäule unter Verwendung einer Gradientenelution mit Wasser (0,1% TFA)/90% Acetonitril-Wasser (0,1% TFA) liefert 30 mg (BOC)Gly-D-Tyr(O-t but)-D-Lys(ITC-Bz-DTPA)-OH als einen farblosen Feststoff. Analytische Phasenumkehr-HPLC zeigt ein einzelnes Maximum mit einer Verweilzeit von 7,54 Minuten. Massenspektrenanalyse ergab ein M+H Maximum bei m/e 1063 (positiver Ionenmodus) und das M-H Maximum bei m/e 1061 (negativer Ionenmodus). Dieses Material wird anschließend mit einem Gemisch aus TFA/ CH_2Cl_2 /Anisol für eine Stunde behandelt, und die BOC- und Tyr(O-t but)-Schutzgruppen werden abgespalten. Die Titelverbindung wird durch Zugabe des Reaktionsgemischs zu Ethylether präzipitiert. Die HPLC-Verweilzeit war 5,31 Minuten. Massenspektrenanalyse zeigte ein M+H Maximum bei 907 und ein M-H Maximum bei 906.

Beispiel 3. Herstellung von (MCC)Gly-D-Tyr-D-Lys(ITC-Bz-DTPA)-OH

0,025 g (0,0138 mmol) des Produktes aus Beispiel 2 werden in 0,5 ml 0,1 M Natriumphosphat mit einem pH-Wert von 7,0 gelöst. Dazu werden 0,03 g handelsüblich erhältliches Sulfosuccinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)-1-carboxylat (SMCC) hinzugegeben, und der pH-Wert wird auf 7,17 erhöht. Die klare Lösung wird für eine Stunde gerührt. Präparative HPLC an einer präparativen Phasenumkehrsäule unter Verwendung der gleichen Gradientenelution wie in Beispiel 1 liefert 0,0054 g der Titelverbindung [worin MCC für den 4-(N-Maleimidomethyl)-1-carbonyl-Rest steht]. Die Verweilzeit des gereinigten Materials (analytische RP-Säule) beträgt 6,36 Minuten. Elektrospray-Massenspektrenanalyse zeigte ein M+H Maximum bei m/e 1126 und ein M-H Maximum bei m/e 1124.



Beispiel 4. Radioiodierung des Produktes aus Beispiel 3, Konjugationen mit einem DTT-reduzierten monoklonalen Antikörper-IgG [LL2] und mit einem DTT-reduzierten monoklonalen Antikörper-IgG [RS7]

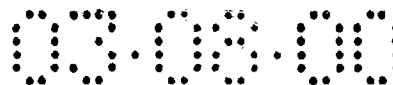
10 Nanomol des Produktes aus Beispiel 3 werden mit 1,72 mCi I-125-Natriumiodid nach einem Iodogen-Iodierungsverfahren radioiodiert. Das markierte Substrat wird in ein zweites Reaktionsgefäß überführt und mit 60 nmol 4-Hydroxyphenylelessigsäure behandelt, gefolgt von einer Reaktion mit 0,6 mg eines Anti-Lymphoma-Antikörpers [LL2], der zuvor mit Dithiothreitol reduziert wurde, um durch Reduktion einer oder mehrerer Zwischenkettendisulfidbindungen des Antikörpers Thiolgruppen zu erzeugen. Nach 1-2 Stunden der Reaktion wird die Lösung auf 5 mM Natriumtetrathionat gebracht, für 5 Minuten inkubiert und an einer zentrifugierten Größenausschlußsäule aus Sephadex® 50/80 in 0,1 M Natriumphosphat mit einem pH-Wert von 7 gereinigt. Basierend auf der auf die Säule aufgetragenen Menge an Aktivität, wird eine 37,4%-ige Rückgewinnung von Radioaktivität von antikörpergebundenem Material erreicht, welches 95% rein war, wie es durch Größenausschlußchromatographie über HPLC bestimmt wurde. Die bei diesem Verfahren erzielte spezifische Aktivität beträgt 0,94 mCi/mg.

Bei einer Variation dieses Verfahrens werden 10 nmol des Produkts aus Beispiel 3 mit 2,24 mCi I-125-Natriumiodid unter Verwendung von Chloramin T als Oxidationsmittel für 1-2 Minuten radioiodiert. Nicht verbrauchtes aktives Iod wird mit 4-Hydroxyphenylelessigsäure gelöscht, mit Kaliumiodid verdünnt und mit 0,5 mg mit DTT reduziertem LL2 für 15-40 Minuten umgesetzt. Die Aufarbeitung und Chromatographie erfolgt, wie es oben beschrieben ist. Hierdurch wird eine Gesamtausbeute von 41% bis 43% mit einer spezifischen Endaktivität im Bereich von 1,98 bis 2,09 mCi/mg erzielt.

Das Produkt aus Beispiel 3 (10 nmol) wird mit 1,46 mCi NaI (I-125) unter Verwendung von Iodogen als Oxidationsmittel radioiodiert, und das radioiodierte Material wird mit DTT-reduziertem RS7 (0,5 mg) konjugiert. Es wird eine Gesamtausbeute (nach Reinigung) von 29,3% mit einer spezifischen Endaktivität von 1,0 mCi/mg erhalten. Analyse des gereinigten Materials mit analytischer SEC-HPLC zeigt eine mit dem Antikörper verbundene Radioaktivität von > 98%.

Beispiel 5. *In vitro*-Bindungsuntersuchungen

Das Produkt aus Beispiel 4 wird mit Raji-Zellen (10^6 Zellen/ml in Dulbeccos Doppel-Eagle-Medium) in einem bei 37°C gehaltenen sterilen Inkubator inkubiert. Nach 2 Stunden werden die Zellen durch Zentrifugation zu einer Tablette geformt, und der Lösungsüberstand wird verworfen. Die Zellen werden dreimal mit kaltem Medium gewaschen. Die gewaschenen Zellen werden in frischem Medium resuspendiert und in einen Inkubator gestellt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wird ein bekanntes Volumen der Zellsuspension abgenommen, pelletiert und die mit dem Zellpellet verbundene Aktivität bestimmt. Das Kontrollexperiment umfaßt die Verwendung des gleichen Antikörpers, der direkt nach einem Chloramin T Verfahren (Negativkontrolle) markiert wurde, oder des gleichen Antikörpers, der mit In-111 (durch Markierung des Produkts von Beispiel 3 mit In-111-Acetat, gefolgt von Bindung an DTT-reduziertes LL2 als eine Positivkontrolle)



markiert wurde. Durch Vergleich mit direkt radioiodiertem LL2 wurde herausgefunden, daß das Produkt aus Beispiel 4 länger mit den Raji-Zellen verbunden war. Diese Retention gleicht der Retention von In-111 an Raji-Zellen. [% beibehaltene anfänglich gebundene cpm: für I-125 markierte LL2: 94,7% (2 h), 63,8% (26 h), 51,1% (48 h) und 35,4% (120 h); für In-111 markierte LL2: 98,2% (2 h), 68,1% (26 h), 49,8% (48 h) und 34,1% (120 h).

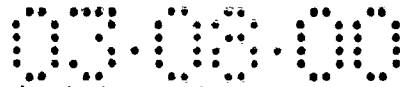
In gleicher Weise wurden *in vitro*-Bindungen an Calu 3, eine nicht kleine Lungenadenokarzinom-Zelllinie, von RS7, welches mit einer zurückbleibenden Markierung dieser Erfindung radioiodiert wurde (das heißt das Produkt von Beispiel 3, welches radioiodiert und an DTT-reduzierte RS7 gebunden wurde), und von auf herkömmliche Weise radioiodiertem RS7 verglichen. Die Daten aus diesem Beispiel zeigten, daß die zurückbleibende Markierung eine deutlich verlängerte Retention zeigte, verglichen mit derjenigen der herkömmlichen Iodmarkierung.

Beispiel 6. Schema IV, Herstellung von N,N-Bis-(Carboxymethyl)-N'-[2-(p-hydroxyphenyl)-ethyl]-2-[p-isothiocyanatobenzyl]-ethylendiamin A und des entsprechenden Maleimids B

4-Nitrophenylanilin wird mit Boran in THF reduziert. Umsetzung mit zwei Äquivalenten tert-Butylbromacetat und wasserfreiem Natriumcarbonat in Acetonitril unter Rückfluß liefert nach schneller chromatographischer Reinigung ein dialkyliertes Produkt in einer Ausbeute von 67,9%. Das 400-MHz Protonen-NMR-Spektrum dieses Produkts stimmt vollständig mit der strukturellen Zuordnung überein. Das Zwischenprodukt (0,1 g) wird in hoher Ausbeute unter Verwendung von DMSO/Oxalylchlorid bei -78°C, gefolgt von einer Behandlung mit Triethylamin in hoher Ausbeute zu Aldehyd oxidiert, und das gereinigte Produkt wird mit Tyramin in der Gegenwart von Natriumcyanoborhydrid in wäßrigem Methanol umgesetzt. Dieses Zwischenprodukt mit angebundenem Tyramin (70% Gesamtausbeute) ist durch ein M+H Maximum bei m/e 544 (Elektrospray-Massenspektrum, positiver Ionenmodus) gekennzeichnet. Katalytische Hydrierung der Nitrogruppe zu einem Anilinderivat (das Produkt wird durch ein Massenspektrum charakterisiert), gefolgt von einer zweistufigen Reaktionssequenz (welche Schutzgruppenentfernung von Carboxyl schützenden Gruppen unter Verwendung von Salzsäure und eine anschließende Reaktion mit Thiophosgen in 3 M Salzsäure umfaßt) liefert das Isothiocyanatderivat A, welches wiederum in zwei Stufen (Reaktion mit Ethylendiamin, gefolgt von einer Behandlung mit SMCC, wie es in Beispiel 3 beschrieben ist) zu dem Maleimidderivat B umgewandelt wird.

Beispiel 7. Radioiodierungen von Lymphoma-Antikörper (LL2) unter Verwendung von I-125-markiertem A oder I-125-markiertem B (A und B von Schema IV)

Radioiodierung von 10 nmol A (Na^{125}I /Iodogen), gefolgt von Löschen von nicht umgesetztem Radioiod mit 40 nmol wäßrigem Phenol und anschließender Umsetzung mit 1,37 mg LL2 bei pH 8 bis 8,2 für 3 Stunden bei 37°C ergibt eine Aufnahme von 32,8%. Es wurden Experimente unter Verwendung von geringeren Antikörpermengen durchgeführt, um die spezifische Aktivität zu erhöhen. Eine Aufnahme von 23,7% bei einer spezifischen Aktivität von 1,1 mCi/mg und eine Aufnahme von 24,1% bei einer spezifischen Aktivität von 1,4 mCi/mg werden erreicht. Der Ag-



gregatgehalt war 2% niedrig. Bei Verwendung von B und reduziertem LL2 (die Reduktion wurde durchgeführt wie in Beispiel 4) wurde eine Aufnahme von 28,4% bei einer spezifischen Aktivität von 0,95 mCi/mg bei vernachlässigbarer Aggregation erreicht.

5 **Beispiel 8. Herstellung von Dimelibiitoltyramin**

Das Titelprodukt wird unter Verwendung von 2,23 g (6,55 mmol) Melibiose, 0,089 g (0,657 mmol) Tyramin und 0,169 g (2,63 mmol) Natriumcyanoborhydrid in 5 ml Boratpuffer mit einem pH-Wert von 9 bei 65°C für 18 Stunden hergestellt. Die Lösung wird auf einen pH-Wert von 4,6 angesäuert und an einer 2,5 cm (Außendurchmesser) und 10 cm hohen Säulen aus Do-

10 wex 50-X2 Kationenaustauscherharz, gepackt in 0,05 M Ammoniumacetat mit einem pH-Wert von 4,6, gereinigt. Die Elution wird mit dem gleichen Puffer durchgeführt, gefolgt von einem linearen Gradienten von 1 l Wasser und 1 l 1 M Ammoniumhydroxid mit einer Strömungsrate von 2-3 ml/Minute. Es werden Fraktionen von jeweils 4 ml gesammelt. Die Untersuchung der Fraktionen durch UV-Absorption bei 280 nm liefert das Elutionsprofil. Das Elutionsprofil enthält ein einzelnes

15 Maximum. Dementsprechend werden die Eluatfraktionen 60-70 vereinigt, eingedampft und lyophilisiert, wobei man 0,98 g eines farblosen Feststoffes erhält, der das Titelprodukt und ein anorganisches Salz umfaßt. Der Gehalt an Dimelibiitoltyramin in einer wäßrigen Lösung wird unter Verwendung des Absorptionswertes bei 280 nm bestimmt. Das Elektrospray-Massenspektrum des lyophilisierten Materials zeigt das korrekte M+H Maximum bei m/e 790.

20

Beispiel 9. Radioiodierung von LL2 unter Verwendung von I-125-DMT

In einem Experiment werden 10 nmol DMT mit I-125 (Iodogen-Verfahren) markiert. Das iodidierte DMT wird dann mit etwa 10 Einheiten Galaktose-Oxidase bei 30°C für 2,5 Stunden oxidiert. Das oxidierte ¹²⁵I-DMT wird mit äquimolarer Menge (10 nmol) LL2 und 20 mM Natriumcyanoborhydrid bei der gleichen Temperatur für 18 Stunden umgesetzt. Die Aufnahme beträgt

25 18,7%, was reproduzierbar ist (20,7% in einem zweiten Durchlauf).

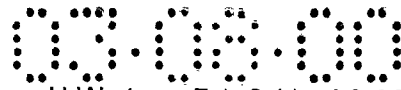
Beispiel 10. In vitro-Bindung des Produktes aus Beispiel 9 an Raji-Zellen

Das Experiment wird analog zu demjenigen, welches in Beispiel 5 beschrieben ist, durchgeführt, wobei als eine Kontrolle ein direkt radioiodierter Antikörper (nach einem Chloramin-T-Verfahren) verwendet wird. Die Ergebnisse zeigten eine signifikante Retention des Produktes aus

30 Beispiel 9, verglichen mit demjenigen der Kontrolle, an Raji-Zellen über einen Zeitraum von 170 Stunden.

35 **Beispiel 11. Schema I: Umsetzung von thiolhaltigem Antikörper mit einem Maleimid enthaltenden Hydrazid und anschließend mit oxidiertem Kohlenwasserstoff**

In der ersten Stufe dieses Schemas wird/werden IgG-Disulfidbindung(en) mit Dithiothreitol reduziert. Zusammengefaßt werden 0,55 ml eines internalisierenden Anti-Lymphoma-Antikörpers LL2, beschrieben von Pawlak-Byczkowska et al., Cancer Research 49: 4568-77 (1989), mit ei-



- nem gleichen Volumen Natriumphosphatpuffer mit einem pH-Wert von 7,4, 0,11 ml 0,5 M Borat-
 puffer mit einem pH-Wert von 8,5 und 6 µl 0,4 g/ml Dithiothreitol in Wasser gemischt. Das Reak-
 tionsgemisch wird mit einem Wirbelmischer gemischt und bei Raumtemperatur für 30 Minuten
 inkubiert. Der am Thiol reduzierte Antikörper wird anschließend durch Größenausschlußchroma-
 5 tographie gereinigt, indem die reduzierte Proteinlösung durch ein Sephadex® 50/80 Harz, wel-
 ches in Phosphatpuffer bei pH 7,0 äquilibriert wurde, hindurchgeleitet wird.

In der zweiten Stufe dieses Schemas wird eine Hydrazidgruppe in den LL2 eingeführt. 10
 Äquivalente Hydrazid-Maleimid M_2C_2H , gelöst in Dimethylformamid, werden für jede SH-Gruppe
 an dem IgG zu der vorbereiteten Antikörperlösung hinzugegeben. Die Inkubation wird bei 37°C
 10 für 2 Stunden fortgesetzt. Um die Reaktion zu löschen, wird ein 50-facher molarer Überschuß an
 N-Ethylmaleimid hinzugegeben und die Inkubation für weitere 30 Minuten bei 37°C fortgesetzt.
 Das behandelte IgG wird anschließend durch Größenausschlußchromatographie gereinigt.

In der dritten Stufe dieses Schemas wird IgG mit Dimelibiitol- $^{125/131}I$ -Tyramin konjugiert.
 Dimelibiitoltyramin wird zuerst mit radioaktivem Natriumiodid unter Verwendung von Iodogen ra-
 15 dioiodiert. Das iodierte Dimelibiitoltyramin wird nach einem der von Strobel et al., Arch. Biochem.
 Biophys. 240: 635-45 (1985) zusammengefaßten Verfahren mit Galaktose-Oxidase oxidiert. Das
 behandelte IgG wird mit der Aldehydgruppe von oxidiertem Dimelibiitoltyramin in einem molaren
 Verhältnis von 1:1 in Phosphatpuffer bei pH 7,7 konjugiert. Nach zwei Stunden wird Natriumcya-
 noborhydrid zu einer Endkonzentration von 20 mM hinzugegeben, und das Reaktionsgemisch
 20 wird für eine weitere Stunde inkubiert. Das Konjugat, welches Dimelibiitol- $^{125/131}I$ -Tyramin enthält,
 wird wieder durch Größenausschlußchromatographie bei pH 7,4 gereinigt.

Beispiel 12. Schema I: Thiolierung von Antikörper und anschließende Bindung über ein Maleimid enthaltendes Hydrazid

25 In der ersten Stufe dieses Schemas wird wenigstens eine Thiolgruppe durch Umsetzung
 mit einem thiolierenden Reagens (1) in einen Antikörper eingeführt. Das thiolierende Reagens
 wird in Dimethylformamid zu einer Endkonzentration an Dimethylformamid von 5% Vol./Vol. ge-
 löst. Der Thiolgehalt des hergestellten Antikörpers wird nach dem Ellman-Test bestimmt. Der
 thiolierte Antikörper wird in Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 7,5 equilibriert und anschlie-
 30 ßend mit einem 4- bis 10-fachen Überschuß des Maleimid-Hydrazid-Reagenzes M_2C_2H reagieren
 gelassen. Nach der Umsetzung zwischen dem Antikörper und dem Reagens MPBH wird das
 Konjugat durch Größenausschlußchromatographie gereinigt. Der Antikörper, in den Hydrazid
 eingeführt wurde, wird dann an oxidiertes Dimelibiitol- ^{123}I -Tyramin gebunden, indem nach den
 Verfahren vorgegangen wird, die in den Stufen 2 und 3 des oben genannten Beispiels 11 be-
 35 schrieben sind.



Beispiel 13. Schema II: Einführung eines Maleimid enthaltenden Hydrazids in oxidierten Kohlenwasserstoff, gefolgt von Bindung an Antikörper

In diesem Schema wird oxidiertes Dilactitol-¹²³I-Tyramin mit einem zweifachen Überschuß an M₂C₂H in Phosphatpuffer zwischen pH 6 und pH 7 für eine Stunde inkubiert. Anschließend wird der thiolierter Antikörper, welcher hergestellt wurde, wie es oben in Beispiel 1 oder Beispiel 2 beschrieben ist, zu dem Inkubationsgemisch hinzugegeben. Nach einer weiteren Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur wird Iodacetamid hinzugegeben und für weitere 30 Minuten inkubiert, um nicht umgesetztes Thiol zu löschen. Natriumcyanoborhydrid wird auf eine Endkonzentration von 10 mM hinzugegeben und für eine Stunde inkubieren gelassen. Der hergestellte Antikörper wird aus dem Endreaktionsgemisch durch Größenausschlußchromatographie gereinigt.

Beispiel 14. Schema III: Cyanurdichlorid-Kopplung von Antikörper mit zurückbleibender Markierung

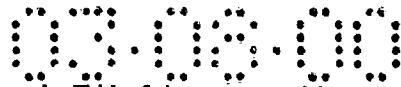
In diesem Schema wird ein substituiertes Cyanurdichlorid verwendet, um Antikörper mit zurückbleibender Markierung zu koppeln. Das Cyanurdichloridderivat wird in Dimethylformamid oder in Dimethylsulfoxid gelöst und anschließend zu einer Lösung von Dilactitol-¹²³I-Tyramin in Wasser hinzugegeben.

Im Falle einer Kopplung mit einem Cyanurdichloridanalogen wird das Cyanurdichloridanaloge zuerst mit der zurückbleibenden Markierung für 90 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach dem Abkühlen wird die Antikörperlösung in einem Phosphatpuffer hinzugegeben und das Gemisch für drei Stunden bei 37°C inkubiert. Der pH-Wert der Antikörperpufferlösung wird so eingestellt, daß der Reaktions-pH-Wert am Ende bei der Kopplung an den Antikörper zwischen pH 7-8 beträgt. Der pH-Wert am Ende beträgt zwischen pH 6-7 für den Fall der Kopplung mit thioliertem Antikörper. Der Antikörper wird durch Größenausschlußchromatographie von anderen Reaktanten gereinigt.

Für jedes dieser Beispiele wird die Konjugationseffizienz durch Messung der Menge an I-¹²³, welches in Protein aufgenommen wurde, und der Menge an zurückgewonnenem Protein bestimmt. Das Ausmaß an IgG-Aggregation wird durch Molekulargrößenanalyse des hergestellten IgG unter Verwendung von analytischer Größenausschluß-HPLC oder Polyacrylamid-Gelelektrophorese in der Gegenwart von Natriumdodecylsulfat bestimmt.

Die optimalen Mengen an zurückbleibendem Agens, Antikörper und anderen Reagenzien in diesen Reaktionen werden durch Variieren ihrer molaren Verhältnisse und Messen der spezifischen Aktivitäten, Bindungsaffinitäten und Mengen an Konjugat, welches unter der jeweiligen Reaktionsbedingung gebildet wird, bestimmt.

Beispiel 15. Vergleichende Bioverteilungen von Lymphoma-Antikörper LL2, welcher mit zurückbleibender I-¹²⁵-Markierung, erhalten aus dem Produkt von Beispiel 3, oder mit I-



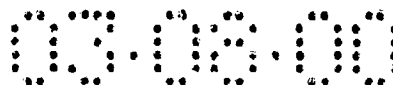
131 unter Verwendung des herkömmlichen Chloramin-T-Verfahrens markiert wurde, in nackten Mäusen, welche menschliche Ramos-Tumoxenograften tragen.

Tumore wurden in vier Wochen alten weiblichen nackten Mäusen unter Verwendung der Ramos-Tumorzelllinie wachsen gelassen. Nach zwei Wochen erreichen die Tumore die Größe von etwa 0,1 bis 0,2 g. In dieser Stufe wurden Gruppen von fünf Mäusen jeweils etwa 10 µCi der zwei Iodmarkierungen (I-125 zurückbleibend und I-131 herkömmlich), die beide in dem gleichen Reaktionsgefäß enthalten waren, verabreicht. Die Doppelmarkierung liefert die präziseren Vergleiche, da Variationen der Antikörperdosis und Tumorgroße nicht vorhanden sind. Die Tiere werden 1 Tag, 3 Tage, 5 Tage, 7 Tage und 10 Tage nach der Verabreichung des markierten Antikörpers getötet. Verschiedene Tumor enthaltende Organe werden herausgeschnitten; die mit den Organen verbundene Radioaktivität wird als ein Prozentsatz der injizierten Dosis pro Gramm (% ID/g) ausgedrückt. Die aus diesem Beispiel erhaltenen Daten zeigen eine verlängerte Retention und überragende Tumor:Nicht-Tumor-Verhältnisse der Zunahme für zurückbleibende I-125-Markierung gegenüber herkömmlich hergestellter (CT-Verfahren) I-131-Markierung.

15

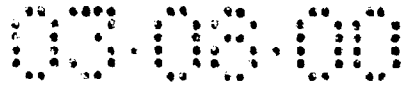
Aus den vorangegangenen Beschreibungen kann ein Fachmann leicht die wichtigen Merkmale dieser Erfindung entnehmen und ohne von deren Umfang abzuweichen verschiedene Veränderungen und Modifikationen der Erfindung vornehmen, um diese an verschiedene Anwendungen und Bedingungen anzupassen.

20

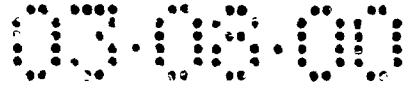


Patentansprüche

1. Peptid mit angebundenem Aminopolycarboxylat, das für Radiojodierung eines Antikörpers geeignet ist, mit
 - a) einem Peptid, das wenigstens ein D-Tyrosin oder Tyramin, einen Aminoterminus, einen von einem D-Lysin gebildeten Carboxyterminus und keine benachbarten L-Aminosäuren zwischen dem D-Tyrosin oder Tyramin und dem Carboxyterminus umfaßt,
 - b) einem Aminopolycarboxylat, das über eine seiner Carbonsäuregruppen mit dem Peptid über eine ϵ -Aminogruppe des D-Lysins konjugiert ist, um ein Peptid mit angebundenem Aminopolycarboxylat zu bilden, und
 - c) einem Rest, der mit dem Peptid mit angebundenem Aminopolycarboxylat konjugiert ist und eine funktionelle Gruppe für eine kovalente Bindung an einen Antikörper umfaßt.
2. Peptid mit angebundenem Aminopolycarboxylat nach Anspruch 1, weiterhin mit einem Radiojodatom, das kovalent an den D-Tyrosin- oder Tyraminrest gebunden ist.
3. Peptid mit angebundenem Aminopolycarboxylat nach Anspruch 1, bei dem die funktionelle Gruppe mit einem Sulfhydrylrest eines Antikörpers unter Bildung einer kovalenten Bindung reagieren kann.
4. Peptid mit angebundenem Aminopolycarboxylat nach Anspruch 1, bei dem das Peptid 5 bis 40 Aminosäuren enthält.
5. Radiojodiertes Peptid mit angebundenem Aminopolycarboxylat nach Anspruch 2, bei dem das Peptid 5 bis 40 Aminosäuren enthält.
6. Peptid mit angebundenem Aminopolycarboxylat nach Anspruch 1, bei dem das Tyramin oder D-Tyrosin direkt an das D-Lysin gebunden ist.
7. Peptid mit angebundenem Aminopolycarboxylat nach Anspruch 1, bei dem das Aminopolycarboxylat aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Nitrilotriessigsäure, EDTA, DTPA, TTHA und im Grundgerüst substituierten Derivaten von Nitrilotriessigsäure, EDTA, DTPA und TTHA besteht.



8. Peptid mit angebundenem Aminopolycarboxylat, das brauchbar für Radiojodierung eines Antikörpers ist, mit
 - 5 a) einem Peptid, das wenigstens ein D-Tyrosin oder Tyramin, einen Aminotermminus, einen von einer D-Aminosäure gebildeten Carboxyterminus und keine benachbarten L-Aminosäuren zwischen dem D-Tyrosin oder Tyramin und dem Carboxyterminus umfaßt,
 - 10 b) einem Aminopolycarboxylat, das über eine seiner Aminogruppen mit dem Peptid über eine Amidbindung zu einer Peptidcarbonsäuregruppe oder über eine Thioharnstoffbindung zu einem Peptidaminosäurerest unter Bildung eines Peptids mit angebundenem Aminopolycarboxylat konjugiert ist, und
 - 15 c) einem Rest, der mit dem Peptid mit angebundenem Aminopolycarboxylat konjugiert ist und eine antikörperreaktive funktionelle Gruppe umfaßt.
9. Peptid mit angebundenem Aminopolycarboxylat nach Anspruch 8, bei dem das Aminopolycarboxylat aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Nitrilotriessigsäure, EDTA,
 - 20 DTPA, TTHA und im Grundgerüst substituierten Derivaten von Nitrilotriessigsäure, EDTA, DTPA und TTHA besteht.
10. Aminopolycarboxylatkonjugat, das brauchbar für Radiojodierung eines Antikörpers ist, mit
 - 25 a) einem Aminopolycarboxylat und
 - b) wenigstens einem D-Tyrosin- oder Tyraminrest, wobei der Rest über seine Aminogruppe mit einer Carboxylgruppe des Aminopolycarboxylats konjugiert ist.
- 30 11. Aminopolycarboxylatkonjugat nach Anspruch 10, weiterhin mit einem Radiojodatom, das kovalent an den D-Tyrosin- oder Tyraminrest gebunden ist.
12. Peptid mit angebundenem Aminopolycarboxylat nach Anspruch 10, bei dem das Aminopolycarboxylat aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Nitrilotriessigsäure, EDTA, DTPA,
 - 35 TTHA und am Grundgerüst substituierten Derivaten von Nitrilotriessigsäure, EDTA, DTPA und TTHA besteht.
13. Beständiges oxidiertes Disaccharidaddukt, das zur Radiojodierung eines Antikörpers brauchbar ist, mit



- a) einem oxidierten Disaccharid, welches Galaktose und wenigstens eine Carbonylgruppe umfaßt, und
- 5 b) einem D-Tyrosin oder Tyramin.
- 14 Beständiges oxidiertes Disaccharidaddukt nach Anspruch 13, weiterhin mit einem Radiojodatom, das kovalent an das D-Tyrosin oder Tyramin gebunden ist.
- 10 15. Beständiges oxidiertes Disaccharidaddukt nach Anspruch 13, bei dem das Disaccharid aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Dimelibiotoltyramin, Melibiotoltyramin, Melibiotol-(D)-tyrosin und Dimelibiotol-(D)-tyrosin besteht.
- 15 16. Beständiges oxidiertes Disaccharidaddukt nach Anspruch 13, weiterhin mit einem Antikörper bindenden Rest, der eine funktionelle Gruppe umfaßt, die aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus einem Aldehyd, einem Amin, einem Isothiocyanat, einem N-Hydroxysuccinimidester, einem Imidatester, einem Maleimid, einem Bromacetamid und einem Jodacetamid besteht.
- 20 17. Beständiges oxidiertes Disaccharidaddukt nach Anspruch 13, weiterhin mit einem monosubstituierten Cyanurmonochlorid.
18. Beständiges oxydiertes Disaccharidaddukt nach Anspruch 17, bei dem das Cyanurmonochlorid mit einem Maleimid monosubstituiert ist.

25